



# Caractérisation structurale et biophysique de Elmo1 et des interactions avec son partenaire

Marion Sevajol

## ► To cite this version:

Marion Sevajol. Caractérisation structurale et biophysique de Elmo1 et des interactions avec son partenaire. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY104 . tel-00875173

**HAL Id: tel-00875173**

**<https://theses.hal.science/tel-00875173>**

Submitted on 21 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Marion SEVAJOL**

Thèse dirigée par **Dominique HOUSSET** et  
co-dirigée par **Jean-Baptiste REISER**

préparée au sein de **L'Institut de Biologie Structurale JP. EBEL**  
dans **l'École Doctorale de Physique, Grenoble**

## Caractérisation structurale et biophysique de Elmo1 et des interactions avec son partenaire

**Une protéine impliquée dans les voies de signalisation du  
remodelage du cytosquelette d'actine.**

Thèse soutenue publiquement le **9 Octobre 2012**  
devant le jury composé de :

**Mr Franck FIESCHI**

Pr à l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble (Examinateur)

**Mme Sylvie RICARD-BLUM**

Pr à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon (Rapporteur)

**Mr Christian DUMAS**

Dr au Centre de Biochimie Structurale, Montpellier (Rapporteur)

**Mr Louis RENAULT**

Dr au Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Gif-sur-Yvette  
(Examinateur)

**Mr Jean-Baptiste REISER**

Dr à l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble (Co-Directeur de thèse)

**Mr Dominique HOUSSET**

Dr à l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble (Directeur de thèse)





# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Pr. Franck Fieschi d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse, le Pr. Sylvie Ricard-Blum et le Dr. Christian Dumas pour la lecture attentive et la critique de mon manuscrit, ainsi que le Dr. Louis Renault pour ses remarques constructives et l'évaluation de mes travaux.

Je remercie le Dr. Dominique Housset de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir encadrée et encouragée tout au long de ma thèse. Je le remercie aussi pour la liberté dont j'ai bénéficié pour mes activités d'enseignements et les nombreuses formations que j'ai suivies durant ces quatre années. Merci également au Dr. Jean-Baptiste Reiser qui m'a soutenue jusqu'au bout de cette aventure en devenant mon co-directeur de thèse. Jean-Baptiste, merci pour toute ton aide scientifique, ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, le Dr. Carlo Petosa et le Dr. Franz Bruckert pour avoir suivi l'avancée de mes travaux et donné de précieux conseils.

Je tiens également à remercier le Dr. Bruno Franzetti et le Dr. Frederic Vellieux avec qui tout a commencé à l'IBS lors de mon stage de Master. Merci de m'avoir formée à la purification des protéines et à la cristallographie des protéines aux rayons X qui m'ont été très utiles durant ma thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe qui ont contribué avec moi à la réussite de ce projet. Jean-Philippe Kleman, merci pour tous tes conseils, tes discussions scientifiques ou non, mais aussi pour ton soutien et ta bonne humeur. Anne Chouquet et Ombeline Pessey, merci pour votre précieuse aide au laboratoire ainsi que pour toutes les discussions qui ont animé la vie du labo. Rida Awad, avec qui j'ai partagé une partie de cette aventure, merci pour toute ta solidarité et ton soutien, à mon tour de te souhaiter bonne chance et beaucoup de courage pour la suite avec Elmo. Merci à Mélanie, tes passages au CIBB ont apporté un peu de fraîcheur dans les moments où j'en avais le plus besoin. Corinne, même si tu ne fais pas partie directement de l'équipe, pour les meilleurs cookies que j'ai mangés, pour les moments de bonheur que tu nous as offerts avec tes gâteaux à la pause-café, merci.

Je remercie le Dr. Pierre Gans et Isabel Ayala pour leur collaboration qui a permis d'apporter une touche de RMN dans notre monde de cristallographie.

Ces travaux de thèse ont pu être réalisés grâce à toutes les personnes qui font vivre les plateformes du PSB. Merci à Nicole Thiellens et Isabelle Bally pour leurs conseils et leur aide sur les appareils de Biacore. Merci à Adam Round et Petra Pernot de m'avoir initiée aux joies du SAXS. Merci à Julien Pérard pour toute son aide technique, mais aussi pour toutes ses idées et ses conseils judicieux pour faire avancer le projet.

Je tiens également à remercier ceux qui m'ont entourée durant ces années Grenobloises en dehors du labo. Merci à Rémi, Thierry, Cyril, Axelle, Nicolas, Audrey, Cyrille et Pauline pour les restos, le ski nocturne, les soirées jeux, les lasergames, etc... qui m'ont permis de décompresser dans les moments difficiles. Merci pour votre présence et votre soutien.

Enfin, je remercie ma famille, qui m'a toujours soutenue durant ces très longues années d'études.



# Table des matières

---



<b>Table des matières.....</b>	<b>3</b>
<b>Table des Figures.....</b>	<b>9</b>
<b>Table des Tableaux.....</b>	<b>15</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>19</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>25</b>
<b>I . L'actine au cœur du cytosquelette.....</b>	<b>27</b>
A . Le cytosquelette.....	27
B . Les constituants du cytosquelette.....	28
1) Les microtubules.....	28
2) Les filaments intermédiaires.....	29
3) Les filaments d'actine.....	29
C . Régulation du réseau d'actine.....	31
1) La nucléation et l'élongation des filaments.....	31
2) Un processus régulé de près.....	32
<b>II . La phagocytose des corps apoptotiques.....</b>	<b>34</b>
A . L'apoptose ou mort cellulaire programmée.....	34
1) Définition.....	34
2) Fonction physiologique.....	34
B . L'élimination des corps apoptotiques.....	35
1) La phagocytose.....	35
2) La phagocytose des corps apoptotiques.....	36
<b>III . La migration cellulaire.....</b>	<b>43</b>
A . Rôle physiologique.....	43
B . Différents mécanismes de migration.....	43
C . Les grandes étapes de la migration.....	44
1) Polarisation.....	45
2) Formation de protrusions.....	45
3) Adhésion.....	46
4) Contraction.....	46
5) Désassemblage des sites d'adhésion.....	46
D . Les bases moléculaires.....	47
<b>IV . Les GTPases Rho.....</b>	<b>49</b>
A . Généralités.....	49
B . Structure.....	50
C . Cycle d'activation des GTPases Rho.....	51
1) Les facteurs d'échange de Guanine (GEF).....	52
2) Les autres régulateurs des GTPases Rho.....	54
<b>V . Le complexe Elmo/Dock.....</b>	<b>56</b>
A . Une cible privilégiée de nombreux piratages.....	56
B . Les protéines de la famille Dock.....	57
1) Sous-famille A.....	60
2) Sous-famille B.....	61
3) Sous-famille C.....	61
4) Sous-famille D.....	62
5) Les domaines fonctionnels.....	62
C . Les protéines de la famille Elmo.....	66
1) Les différents domaines.....	66
2) Localisation cellulaire.....	68
3) Régulation.....	69
D . Le complexe Elmo/Dock.....	70
1) Un mécanisme contradictoire ?.....	70
2) Bases structurales de l'interaction.....	72
<b>VI . Objectifs du travail de thèse.....</b>	<b>74</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>77</b>

<b>I . Biologie Moléculaire.....</b>	<b>79</b>
A . Les outils de base .....	82
1) La préparation d'ADN plasmidique .....	82
2) L'amplification par PCR.....	82
3) La mutagenèse dirigée.....	83
4) La digestion par les enzymes de restriction.....	84
5) La Ligation .....	85
6) La transformation bactérienne par choc thermique .....	86
B . Clonage des fragments de Elmo1 .....	86
1) Méthode LIC .....	86
2) Mutagenèse dirigée.....	89
C . Constructions pour l'analyse par SPR .....	90
1) Etiquette décahistidine sur Elmo1 .....	90
2) Etiquette de biotinylation .....	93
<b>II . Production des protéines.....</b>	<b>101</b>
A . Surexpression des protéines.....	101
1) Extraction cellulaire des protéines solubles .....	101
2) Extraction cellulaire des protéines sous forme de corps d'inclusion .....	102
B . Purification des protéines.....	102
1) Constructions de Elmo et complexes Elmo/Dock.....	102
2) Constructions du domaine SH3 .....	103
C . SDS-PAGE et Western Blot.....	105
1) SDS-PAGE .....	105
2) Western Blot .....	105
D . Biotinylation des protéines .....	106
<b>III . Méthodes de caractérisation des protéines .....</b>	<b>108</b>
A . Spectroscopie d'absorbance .....	108
B . Séquençage N-terminal des protéines .....	109
C . Spectrométrie de masse .....	109
D . Dichroïsme circulaire.....	109
E . SEC-MALLS.....	110
F . Pontage chimique.....	111
<b>IV . Méthodes de caractérisation des interactions protéiques .....</b>	<b>112</b>
A . Co-précipitation.....	112
B . Microcalorimétrie isotherme de titration .....	112
1) Principe .....	112
2) Mode opératoire.....	113
C . Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	113
1) Principe .....	113
2) Fonctionnalisation des surfaces.....	115
3) Tests d'interaction.....	119
4) Traitement des données .....	120
D . Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	122
<b>V . Méthodes de détermination de structures des protéines.....</b>	<b>123</b>
A . Cristallographie aux rayons X des protéines .....	123
1) Cristallogenèse.....	123
2) Stratégie générale de cristallisation .....	125
3) Diffraction des rayons X par un cristal .....	127
B . Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) .....	128
1) Principe .....	128
2) Détermination des paramètres structuraux .....	129
3) Estimation de l'intensité diffusée à partir d'un modèle.....	131
4) Enregistrement des données.....	132
5) Analyse des données .....	133
<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>137</b>
<b>I . Production et caractérisation des protéines .....</b>	<b>139</b>
A . Production des protéines Elmo1.....	139



1) Clonage des gènes.....	139
2) Expression et purification.....	141
3) Caractérisation après purification.....	145
B. Production des protéines Dock.....	149
1) Le domaine SH3.....	149
2) Le domaine SH3-H $\alpha$ .....	152
C. Production des complexes Elmo1/SH3-H $\alpha$ .....	157
1) Expression et purification.....	157
<b>II. Etude de l'interaction de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock1.....</b>	<b>167</b>
A. Essais de mise en évidence de complexes.....	167
1) Co-précipitation.....	167
2) Un complexe instable.....	168
3) Microcalorimétrie isotherme de titration (ITC).....	170
B. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	171
C. Analyse par SPR.....	173
1) Analyse de l'interaction avec les fragments courts.....	175
2) Analyse de l'interaction avec les fragments longs.....	183
3) Analyse de l'interaction avec le fragment ElmoN.....	192
4) Conclusion des données de SPR.....	195
<b>III. Etude de la structure des protéines.....</b>	<b>198</b>
A. Essais de cristallisation.....	198
1) Criblage à grande échelle.....	198
2) Méthylation chimique.....	199
3) Protéolyse ménagée in situ.....	201
B. Localisation des domaines de Elmo1 par SAXS.....	203
1) Détermination des paramètres structuraux.....	203
2) Modélisation ab initio.....	208
3) L'ambiguïté du fragment Elmo $\Delta$ N.....	210
4) Superposition des différents modèles de Elmo1.....	213
5) Reconstruction des domaines manquants à partir d'un domaine connu.....	215
C. Etude du complexe Elmo1/SH3 <sub>1</sub> par SAXS.....	219
1) Détermination des paramètres structuraux.....	219
2) Modélisation ab initio.....	221
D. Etude du complexe Elmo1/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ par SAXS.....	223
E. Conclusion des données de SAXS.....	224
<b>Conclusions et Perspectives.....</b>	<b>227</b>
<b>Références.....</b>	<b>233</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>251</b>
<b>Article.....</b>	<b>255</b>



# Table des Figures

---



Figure 1 : Schéma des différents éléments du cytosquelette.....	28
Figure 2 : Structure tridimensionnelle de l'actine.....	30
Figure 3 : Processus de polymérisation de l'actine.....	30
Figure 4 : Nucléation des filaments d'actine par le complexe Arp2/3.....	32
Figure 5 : Le réseau de régulation de la polymérisation de l'actine.....	33
Figure 6 : Les étapes de la phagocytose.....	36
Figure 7 : Représentation schématique des molécules connues impliquées dans la signalisation de la phagocytose des cellules apoptotiques.....	41
Figure 8 : Migration cellulaire.....	45
Figure 9 : Modèle de la voie de signalisation du chimiotactisme chez <i>D.discoideum</i> .....	48
Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation des GTPases Rho.....	50
Figure 11 : Structure cristalline de la GTPase Rac1.....	51
Figure 12 : Régulation de l'activité des GTPases Rho.....	52
Figure 13 : Les différentes familles des protéines Dock.....	59
Figure 14 : Structure cristalline du domaine DHR1 de Dock 1.....	63
Figure 15 : Structures cristalline du domaine DHR2.....	64
Figure 16: Structure RMN du domaine SH3 de Dock1.....	65
Figure 17 : Représentation schématique des différents domaines de Elmo1.....	66
Figure 18 : Structure cristalline du domaine PH de Elmo1.....	67
Figure 19 : Séquence du motif PxxP de Elmo1.....	67
Figure 20 : Structure cristalline du complexe entre le fragment Elmo $\Delta$ N de Elmo1 et le fragment SH3-H $\alpha$ de Dock2.....	72
Figure 21 : Le complexe Elmo1/Dock1 et ses différents partenaires.....	73
Figure 22 : Schéma de la méthode de mutagenèse dirigée.....	84
Figure 23 : Stratégie de clonage LIC.....	87
Figure 24 : Stratégie de mutagenèse dirigée pour insérer un codon STOP.....	90
Figure 25 : Stratégie de mutagenèse dirigée pour insérer 4 histidines.....	91
Figure 26 : Stratégie de mutagenèse pour supprimer l'étiquette hexahistidine.....	92
Figure 27 : Séquence protéique de l'étiquette de biotinylation. D'après Avidity Avitag <sup>TM</sup> (Avidity).....	93
Figure 29 : Carte du vecteur pCR <sup>TM</sup> -Blunt II-TOPO (Invitrogen).....	96
Figure 31 : Spectre caractéristique de dichroïsme circulaire (CD).....	110
Figure 32 : Schéma de principe du système Biacore.....	114
Figure 33 : Sensorgramme.....	115
Figure 34 : Couplage direct du ligand par son amine primaire.....	116
Figure 35 : Capture du ligand par un anticorps anti-GST.....	117
Figure 36 : Capture du ligand par la streptavidine.....	118
Figure 37 : Couplage du ligand sur une puce NTA.....	119
Figure 38 : Comparaison de la cinétique classique et de la cinétique en un seul cycle.....	120
Figure 39 : Diagramme de phase du processus de cristallogenèse.....	124
Figure 40 : Principe de la goutte suspendue.....	125
Figure 41 : Schéma de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	129
Figure 42 : Représentation de la fonction de distribution des distances.....	130
Figure 43 : Courbe de Guinier et agrégation.....	133
Figure 44 : Courbe de Kratky.....	134
Figure 45 : Sites de coupure de ElmoWT utilisé pour définir les fragments.....	140
Figure 46 : Fragments de Elmo1 qui s'expriment et sont solubles.....	142
Figure 47 : Chromatographie d'affinité de ElmoWT.....	143
Figure 48 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT.....	144
Figure 49 : Dichroïsme circulaire des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH.....	145
Figure 50 : Superposition des courbes de SEC-MALLS de ElmoWT.....	146

Figure 51 : Analyse SDS-PAGE de ElmoWT après pontage chimique par l'EGS. ....	148
Figure 52 : Analyse SDS-PAGE de Elmo $\Delta$ N et ElmoPH après pontage chimique par l'EGS en (A) et par le glutaraldéhyde (Glu) en (B). ....	148
Figure 53 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3 <sub>1</sub> en conditions dénaturantes (6 M urée). ....	150
Figure 54 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3 <sub>1</sub> . ....	150
Figure 55 : Chromatographie d'affinité de SH3 <sub>1</sub> -BirA biotinylé. ....	151
Figure 56 : Révélation par fluorescence à 488 nm du Western Blot de SH3 <sub>1</sub> -BirA biotinylé. ....	151
Figure 57 : Analyse par SDS-PAGE de la purification de GST-SH3 <sub>1</sub> par chromatographie d'affinité. ....	152
Figure 58 : Analyse SDS-PAGE des tests d'expressions des fragments SH3-H $\alpha$ . ....	153
Figure 59 : Chromatographie d'exclusion de taille SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ en condition dénaturantes (urée 6M). ....	153
Figure 60 : Chromatographie d'exclusion de taille SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ après renaturation. ....	154
Figure 61 : Western Blot des tests d'expression et de solubilité des fragments SH3-H $\alpha$ . ....	155
Figure 62 : Chromatographie d'affinité au Nickel de SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ -BirA. ....	156
Figure 63 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ -BirA. ....	156
Figure 64 : Analyse par SDS-PAGE (à gauche) et Western Blot des tests de purification des complexes Elmo1/SH3-H $\alpha$ . ....	159
Figure 65 : Chromatographe d'affinité au Nickel complexe Elmo $\Delta$ N/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	160
Figure 66 : Chromatographe d'affinité au Nickel complexe Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	160
Figure 67 : Chromatographe d'affinité au Nickel complexe ElmoWT/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	161
Figure 68 : Chromatographe d'affinité au Nickel complexe ElmoN/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	162
Figure 69 : Chromatographie d'exclusion de taille de Elmo $\Delta$ N/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	163
Figure 70 : Chromatographie d'exclusion de taille de Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	164
Figure 71 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT/SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$ . ....	165
Figure 72 : Analyse SDS-PAGE de la co-précipitation GST-SH3 <sub>1</sub> /Elmo $\Delta$ N. ....	167
Figure 73 : Profils d'élution des différents échantillons protéiques. ....	169
Figure 74 : Spectre 2D <sup>15</sup> N-HSQC de la protéine <sup>15</sup> N-SH3 <sub>1</sub> en présence de (A) 0 ; (B) 0,5 (C) 1 et (D) 1,5 quantités équivalente de Elmo $\Delta$ N. ....	172
Figure 75 : Spectre 2D <sup>15</sup> N-HSQC de 200 $\mu$ M <sup>15</sup> N-SH3 <sub>1</sub> . ....	173
Figure 76 : Fragments de Elmo1 utilisés pour l'étude SPR. ....	174
Figure 77 : Sensorgrammes SPR de l'interaction des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH avec SH3 <sub>1</sub> sur la piste 3. ....	176
Figure 78 : Sensorgrammes de l'interaction des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH avec SH3 <sub>1</sub> par cinétique de titration en un seul cycle. ....	180
Figure 79 : Détail des deux composantes de l'ajustement à deux ligands pour Elmo $\Delta$ C. ....	185
Figure 80 : Sensorgrammes de l'interaction de la protéine ElmoWT et Elmo $\Delta$ C par cinétique de titration en un seul cycle. ....	186
Figure 81 : Analyse SPR de l'interaction des fragments ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP avec SH3 <sub>1</sub> -BirA par cinétique de titration en un seul cycle. ....	191
Figure 82 : Analyse SPR de l'interaction du fragment ElmoN avec SH3 <sub>1</sub> -BirA par cinétique de titration en un seul cycle. ....	194
Figure 83 : Chromatographie d'exclusion de taille de Elmo $\Delta$ C méthylé. ....	200
Figure 84 : SDS-PAGE du fragment Elmo $\Delta$ C une semaine après sa méthylation. ....	200
Figure 85 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT méthylé. ....	201
Figure 86 : Analyse par SDS-PAGE des digestions enzymatique de ElmoWT. ....	202
Figure 87 : Courbes de diffusion des protéines Elmo1. ....	205
Figure 88 : Courbes de Guinier des fragments protéiques de Elmo1. ....	206

Figure 89 : Courbe de Kratky des différentes protéines Elmo1.....	206
Figure 90 : Fonction de distribution des distances.....	207
Figure 91 : Chromatographie d'exclusion de taille des protéines Elmo1.....	208
Figure 92 : Moyenne des modèles filtrés par DAMMIF des différents fragments de Elmo1. .....	209
Figure 93 : Résultat CRY SOL pour le fragment Elmo $\Delta$ N.....	210
Figure 94 : Résultat de SASREF sans symétrie.....	211
Figure 95 : Deux exemples de mode de dimérisation des fragments Elmo $\Delta$ N obtenus par SASREF sans symétrie.....	211
Figure 96 : Résultat de SASREF avec symétrie C2.....	212
Figure 97 : Modèle des deux modes de dimérisation de SASREF avec symétrie P2.....	213
Figure 98 : Superposition des modèles des protéines ElmoWT en rouge et Elmo $\Delta$ C en vert par le programme SUPCOMB.....	214
Figure 99 : Superposition des modèles des protéines ElmoWT en rouge et ElmoN en violet par le programme SUPCOMB. L'emplacement supposé du fragment Elmo $\Delta$ N est marqué avec un cercle bleu.....	214
Figure 100 : Courbes obtenues par le programme BUNCH.....	215
Figure 101 : Modèles de la protéine ElmoWT par BUNCH.....	216
Figure 102 : Superposition de la structure pdb id 3A98 avec le modèle de BUNCH.....	218
Figure 103 : Superposition des courbes de diffusion de la protéine ElmoWT en rouge et du complexe ElmoWT/SH3 <sub>1</sub> en bleu. La courbe du mélange ElmoWT/SH3 <sub>1</sub> en bleu est plus basse dans la région des plus petits angles, montrant ainsi que la taille moyenne des molécules en solution est plus petite que celle de l'échantillon de ElmoWT.....	221
Figure 104 : Superposition des modèles de Elmo1 seul et en complexe avec SH3 <sub>1</sub> .....	222
Figure 105 : Schéma général du programme automatisé d'analyse des données SAXS d'après (Petoukhov, Konarev et al. 2007).....	223





# Table des Tableaux

---



Tableau I : Récapitulatif des différents orthologues impliqués dans la voie de la phagocytose des corps apoptotiques. ....	38
Tableau II : Récapitulatif des constructions réalisées durant ma thèse. ....	80
Tableau III : Protocole de PCR. ....	82
Tableau IV : Protocole de la réaction de synthèse des brins mutants. ....	83
Tableau V : Protocole de digestion par les enzymes de restriction. ....	85
Tableau VI : Mélange réactionnel pour la ligation d'ADN. ....	85
Tableau VII : Liste des amorces utilisées pour le clonage LIC des fragments de Elmo1. ....	89
Tableau VIII : Liste des amorces pour produire Elmo $\Delta$ PxxP et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP. ....	90
Tableau IX : Liste des amorces pour l'insertion de l'étiquette décahistidine, méthode 1. ....	91
Tableau X : Liste des amorces pour l'insertion de l'étiquette décahistidine, méthode 2. ....	92
Tableau XI : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin. ....	92
Tableau XII : Liste des amorces pour la suppression du codon STOP du vecteur. ....	93
Tableau XIII : Composition du milieu réactionnel de déphosphorylation de l'ADN par la SAP. ....	94
Tableau XIV : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin. ....	95
Tableau XV : Composition du milieu réactionnel pour l'appariement de l'insert contenant une étiquette de biotinylation. ....	95
Tableau XVI : Liste des amorces pour la mutagenèse en une seule étape. ....	97
Tableau XVII : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse en deux étapes. ....	98
Tableau XVIII : Composition du milieu réactionnel de déphosphorylation de l'ADN par la SAP. ....	99
Tableau XIX : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin. ....	99
Tableau XX : Composition du milieu réactionnel pour l'appariement de l'insert contenant une étiquette de biotinylation. ....	99
Tableau XXI : Liste des amorces utilisées pour retrouver le cadre de lecture original. ....	100
Tableau XXII : Composition du milieu réactionnel de biotinylation par BirA. ....	106
Tableau XXIII : Détermination des conditions d'expression de façon soluble des fragments de Elmo1. ....	141
Tableau XXIV : Masses molaires calculées par SEC-MALLS des deux pics de chromatographie d'exclusion de taille. ....	147
Tableau XXV : Récapitulatif des complexes Elmo1/Dock co-transformés en bactérie <i>E.coli</i> BL21(DE3). ....	157
Tableau XXVI : Précipitation des différents échantillons protéiques. ....	170
Tableau XXVII : Récapitulatif des expériences d'ITC réalisées. ....	171
Tableau XXVIII : Niveaux d'immobilisation du ligand SH3 <sub>1</sub> sur la puce. ....	175
Tableau XXIX : Niveaux d'immobilisation du ligand SH3 <sub>1</sub> sur la puce. ....	179
Tableau XXX : Gammes de concentration de Elmo $\Delta$ N et ElmoPH utilisées. ....	179
Tableau XXXI : Gammes de concentration de ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP utilisées. ....	184
Tableau XXXII : Paramètres des cinétiques des ajustements à double ligand par Fityk. ....	187
Tableau XXXIII : Gammes de concentration de ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP utilisées. ....	189
Tableau XXXIV : Paramètres des cinétiques des ajustements par Fityk. ....	192
Tableau XXXV : Gammes de concentration de ElmoN utilisées. ....	193
Tableau XXXVI : Paramètres des cinétiques des ajustements par Fityk du fragment ElmoN. ....	194
Tableau XXXVII : Récapitulatif des constantes cinétiques des différents fragments de Elmo1. ....	196
Tableau XXXVIII : Echantillons de protéine utilisés pour l'analyse SAXS. ....	204
Tableau XXXIX : Paramètres structuraux des différentes constructions de Elmo1 par SAXS. ....	207

Tableau XL : Comparaison par le programme DAMAVER des différents modèles calculés. .....	209
Tableau XLI : Concentration des complexes de protéine utilisés pour l'analyse SAXS. ....	219
Tableau XLII : Paramètres structuraux des complexes Elmo1/SH3 <sub>1</sub> par SAXS. ....	220

# Abréviations

---



ABC : ATP Binding Cassette transporteur  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
Amp : Ampicilline  
Arf : ADP ribosylation factor  
Arp : Actin-Related Proteins  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
BAI1 : Brain specific angiogenesis inhibitor 1  
BAR : Bin, Amphiphysin, Rvs  
BirA : Biotin ligase  
BSA : Bovine Serum Albumine  
C2 : Protein kinase C conserved region 2  
CD4 : Cluster de Différenciation 4  
CD91 : Cluster de Différenciation 91  
Cdc42 : Cell Division Control protein 42 homolog  
CrkII : Cdc2 Related Kinase  
Da : Dalton  
Dbl : Diffuse B-Cell Lymphoma  
DH : Dbl-Homology  
DHR : Dock1-Homology-Region  
Dia1 : Diaphanous formin 1  
DAD : Diaphanous Auto-regulatory Domain  
DID : Diaphanous Inhibitory Domain  
 $D_{\max}$  : Distance maximale  
DMSO : DiMéthylSulfOxyde  
DO : Densité Optique  
Dock : DOWnstream of CrKII  
DTT : DiThioThréitol  
EAD : Elmo Auto-regulatory Domain  
EDC : 1-éthyl-N'-(diéthylaminopropyl)carbodiimide  
EDTA : acide Ethylène Diamine TétraAcétique  
EGF : Ethyl Glycol Succinamide  
EID : Elmo Inhibitory Domain  
ELM : Domaine Elmo  
Elmo : EnguLfment and cell MOtility  
ERM : Ezrin Radixin Moesin  
FH2 : Formin Homology 2  
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography  
GEF : Facteur d'échange de guanine (Guanine Echange Factor)  
Glu : Glutaraldéhyde  
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G (G protein coupled receptors)  
GAP : Protéine activatrice des GTPases (GTPase activating protein)  
GDI : Inhibiteur e la dissociation des nuclotides Guanine (Guanosine nucleotide dissociation inhibitors)  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
GST : Glutathion-S-Transférase  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence  
IL : Interleukine10

IPTG : IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside  
Kan : Kanamycine  
 $K_D$  : Constante d'affinité  
 $k_{off}$  : Constante de dissociation  
 $k_{on}$  : Constante d'association  
LB : Lysogeny Broth  
LIC : Ligation Independant Cloning  
LIMK : Lin11, Isl1, Mec3 Kinase  
LRP1 : Low density lipoprotein receptor-related protein 1  
MBC : MyoBlast City  
MFG-E8 : Milk-Fat-Globule-EGF-factor8  
MFG10 : Milk-Fat-Globule 10  
NHS : N-hydroxy-succinimide  
N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
Nef : Negative Regulatory Factor  
NSD : Normalized Spacial Discrepancy  
NTA : NitriloTriacetic Acid  
PAK : Serine/threonine-protein kinase  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PEG : PolyEthylène Glycol  
pI : Point Isoélectrique  
PH : Plekstrin-Homology  
PI3K : Phosphoinositide 3 kinase  
PIP3 : Phosphatidyl inositol (3,4,5) triphosphate  
PMSF : PhenylMethaneSulfonylFluoride  
PSB : Partnership for Structural Biology  
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
PVDF : PolyVinylidene Di-Fuoride  
PxxP : Polyproline motif  
RBD : RhoG binding Domain  
ROCK : Rho dependent kinase  
Rab : Ras-related in brain  
Ran : Ras-related Nuclear protein  
 $R_g$  : Rayon de Giration  
ROS : Reactive Oxygen Species  
Rho : Ras Homology  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
Sap : Shrimp Alkaline Phosphatase  
SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering)  
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SEC-MALLS : Size Exclusion chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering  
SH3 : SRC Homology 3 Domain  
SPR : Résonance Plasmonique de Surface (Surface Plasmon Resonance)  
TCR : Recepteur des cellules T (T Cell Receptor)  
TEV : Tobacco Etch Virus  
TGF : Transforming Growth Factor



TNT : Tris-HCl, NaCl, Tween

Toca : Transducer of Cdc42 dependant actin assembly

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WAVE : WASP family Verpolin-homologous

WH2 : Wiskott-Aldrich syndrome Homology region 2



# Introduction

---



Le complexe Elmo1/Dock1 a été mis en évidence pour son implication dans la phagocytose des corps apoptotiques et la migration cellulaire (Lu and Ravichandran 2006); Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. (2012). Les protéines Elmo coopèrent avec certaines protéines de la famille Dock, des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) qui activent des GTPases de la famille Rho. Ces protéines de la famille Dock régulent des voies de signalisation dépendant de Rac1 et Cdc42 qui impliquent le remodelage du cytosquelette d'actine.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes d'interactions mis en jeu lors de la formation du complexe Elmo1/Dock1. Je vais introduire ici quelques notions essentielles à la compréhension du sujet qui permettront de replacer le rôle de ce complexe Elmo1/Dock1 dans le contexte cellulaire.

Nous allons dans un premier temps découvrir le cytosquelette d'actine et ses mécanismes de régulation. Nous nous attarderons ensuite sur la description et la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de deux processus cellulaires régulés par le complexe Elmo1/Dock1 impliquant le remodelage du cytosquelette d'actine : la phagocytose des corps apoptotiques et la migration cellulaire. Nous essaierons ensuite de mieux connaître et comprendre les mécanismes de régulation des RhoGTPases comme la GTPase Rac1 activée par Dock1. Enfin, nous ferons le point sur l'état des connaissances concernant les protéines Dock et Elmo et la formation du complexe Elmo1/Dock1.

# I . L'actine au cœur du cytosquelette

## A . Le cytosquelette

La cellule constitue l'unité élémentaire de tout organisme vivant. Son évolution à travers le temps a conduit à la formation d'une grande diversité fonctionnelle. Les organismes ancestraux tels que les bactéries (procaryotes) ou les levures (eucaryotes) bien que s'organisant en colonies, sont des entités individuelles et autonomes. L'apparition d'organismes pluricellulaires (champignons, végétaux, animaux) a contribué à la différenciation et la spécialisation des cellules chez les organismes évolués. Les cellules différenciées, comme par exemple les cellules osseuses, épithéliales, les neurones, les fibroblastes, bien qu'ayant la même information génétique, n'expriment pas forcément les mêmes protéines au même moment et peuvent donc posséder des caractéristiques (phénotypes) complètement différentes. Chaque morphologie sera ainsi très spécifique de la

fonction de la cellule. Cependant, ces architectures sont organisées à partir des mêmes éléments constituant le cytosquelette : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Figure 1). Celui-ci forme un réseau de fibres protéiques qui assurent la forme de la cellule et y ancrent les organites en des sites définis. Ces fibres se différencient par leurs tailles, leurs propriétés mécaniques et leurs fonctions. C'est un système dynamique, s'assemblant et se désassemblant constamment. Chacune des fibres du cytosquelette se construit par polymérisation des sous-unités protéiques identiques s'attirant mutuellement et s'assemblant spontanément en longues chaînes. Leurs sous-unités se libèrent les unes après les autres d'une des extrémités de la chaîne pour se dissocier.

Le cytosquelette permet le maintien ou l'adaptation à l'environnement de la structure cellulaire et le positionnement des organites intracellulaires. Il supporte les fonctions motrices de la cellule : le trafic intracellulaire (déplacement des organites et des vésicules) et la motilité (déplacement cellulaire).

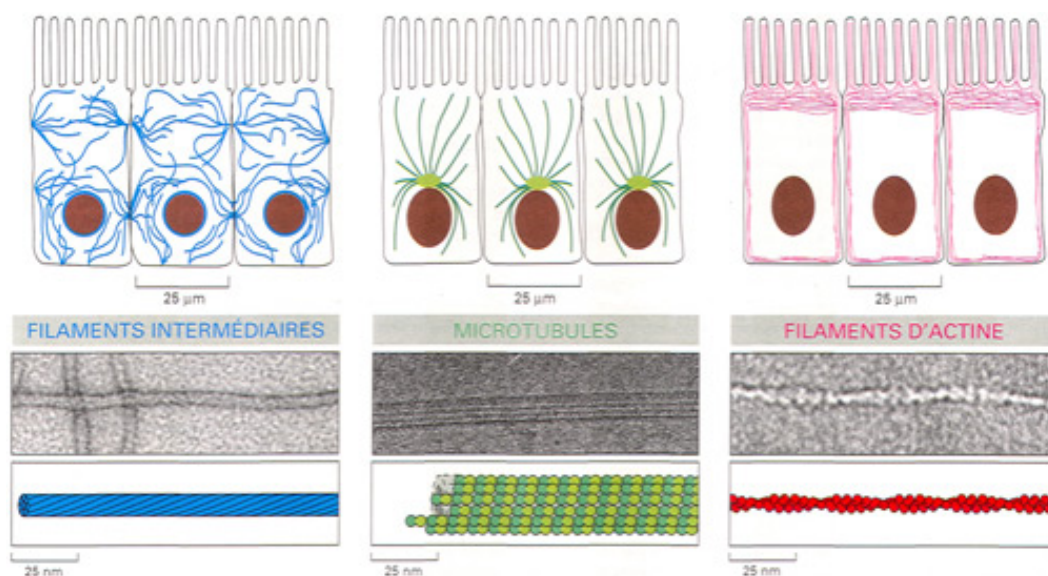


Figure 1 : Schéma des différents éléments du cytosquelette.

En haut, localisation cellulaire. Au centre, images de microscopie électronique. En bas, schéma de structure.

## B . Les constituants du cytosquelette

### *1) Les microtubules*

Les microtubules sont des tubes creux d'un diamètre de 25 nm (Figure 1). Ce sont des polymères très rigides, avec une longueur de persistance de l'ordre du millimètre (Venier,

Maggs et al. 1994). Ils servent de rails empruntés par des moteurs moléculaires (Kinésines et Dynéines) au sein de la cellule. Ces moteurs vont pouvoir délivrer des vésicules aux différents compartiments cellulaires. Par ailleurs, les microtubules permettent la formation du fuseau mitotique nécessaire à la migration des chromosomes lors de la division cellulaire.

## ***2) Les filaments intermédiaires***

Les filaments intermédiaires tirent leur nom de leur diamètre, intermédiaire entre le diamètre du filament d'actine (7nm) et celui des microtubules (25 nm). Dans la cellule, ils forment une mosaïque souple et élastique connectée aux différents organites ainsi qu'à l'enveloppe nucléaire et aux desmosomes (Figure 1). Les filaments intermédiaires semblent avoir un rôle de plateforme de signalisation impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire, la forme et le positionnement des organelles (Pallari and Eriksson 2006).

## ***3) Les filaments d'actine***

L'actine est une protéine très abondante et très bien conservée chez toutes les cellules eucaryotes. Elle représente plus de 20% des protéines des cellules musculaires et des plaquettes (Benyamin, Roger et al. 1980), et de 1 à 10% des cellules non musculaires. Les monomères d'actine (ou actine G pour actine globulaire) s'associent entre eux afin de former une structure fibrillaire, les filaments d'actine ou microfilaments (Figure 2). L'actine est alors dite actine F pour actine filamenteuse. La formation de réseaux de filaments au sein de la cellule est indispensable à la motilité et à la morphogenèse. Le filament d'actine est un polymère de 7 nm de diamètre, composé de deux brins associés de manière hélicoïdale.

Sa polymérisation s'effectue par addition de monomères d'actine G à ses deux extrémités. Ce filament est polarisé, l'addition de sous-unités s'effectue plus rapidement à l'extrémité dynamique, dite barbue, qu'à l'autre extrémité, dite pointue (Figure 3) (Bonder, Fishkind et al. 1983; Carlier 1991). La protéine d'actine est présente dans le cytosol en forte concentration et possède une séquence d'acides aminés conservée à plus de 80 % entre les espèces.

De nombreuses protéines sont impliquées dans l'assemblage de cette structure complexe qui est régulée étroitement afin de répondre aux différents signaux auxquels la cellule est confrontée. La polymérisation des filaments produit la force nécessaire au déroulement de ces différents processus.

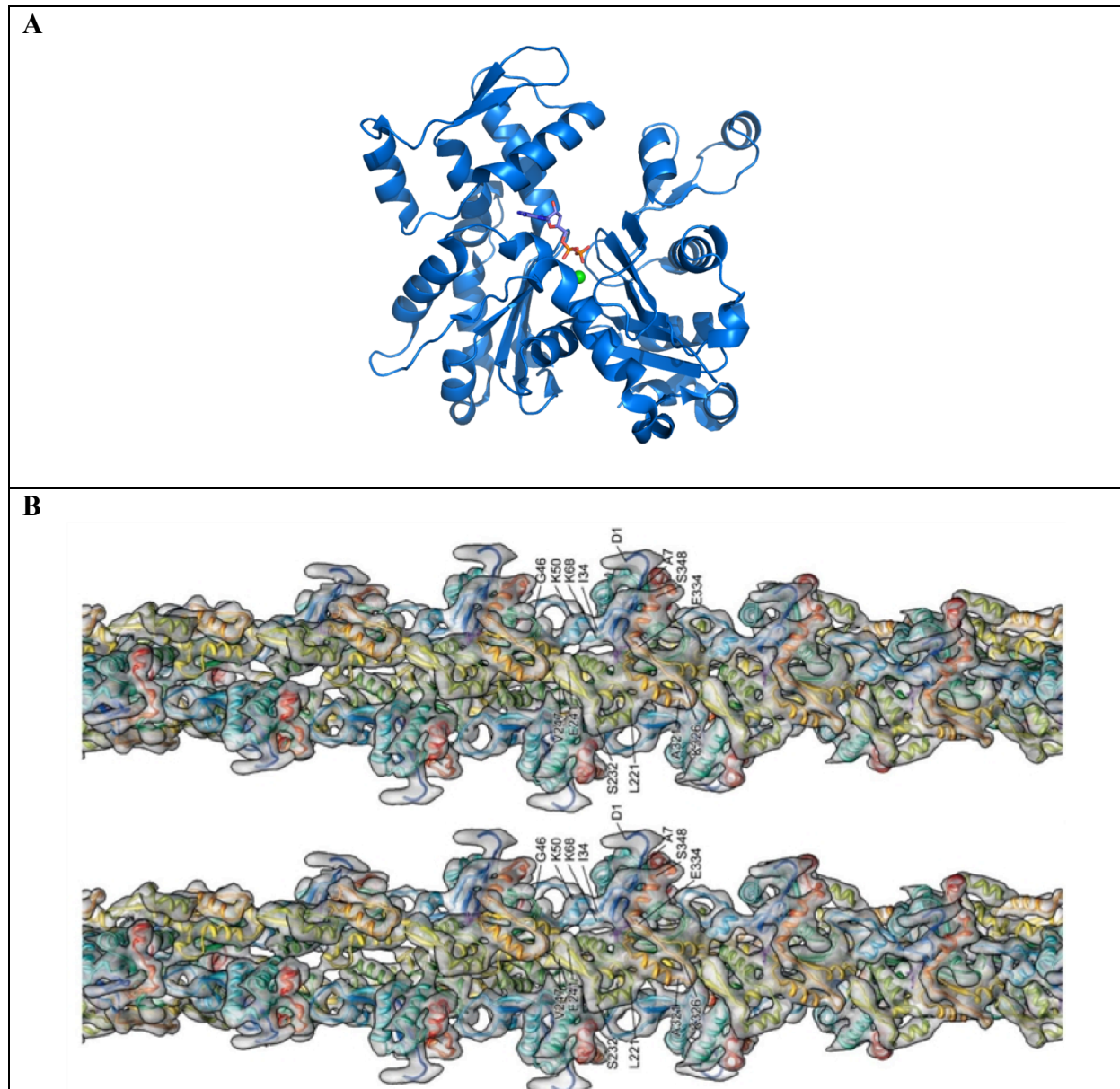


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de l'actine.

**A** : Représentation en ruban du monomère d'actine G (en bleu) avec de l'ADP (en rouge) et un cation divalent (en vert) (Otterbein, Graceffa et al. 2001). **B** : Modèle atomique de l'actine F replacé dans une carte de densité tridimensionnelle en stéréo (environ 15 sous-unités) (Fujii, Iwane et al. 2010).

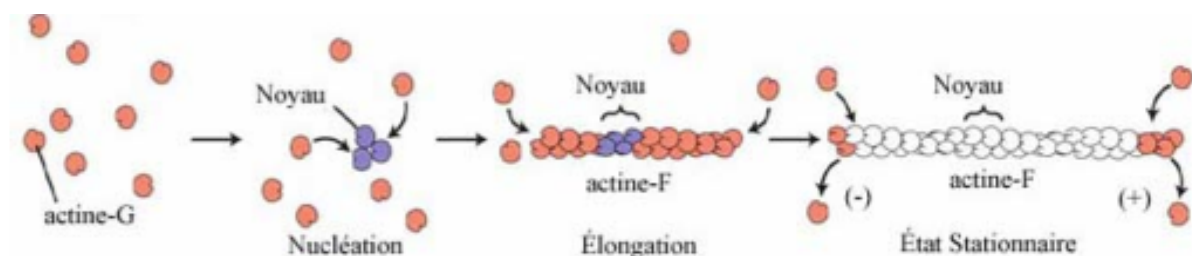


Figure 3 : Processus de polymérisation de l'actine.

Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine G qui forment la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament d'actine F. L'état stationnaire correspond à l'équilibre dynamique du filament.



## C . Régulation du réseau d'actine

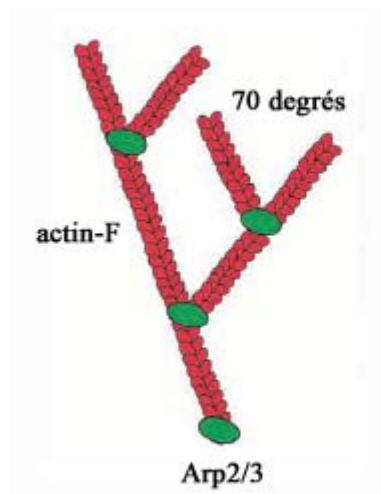
Le cytosquelette d'actine intervient dans plusieurs processus cellulaires. Il doit donc être régulé étroitement pour qu'il y ait une polymérisation adéquate aux endroits et aux moments désirés. La dynamique du réseau d'actine est pilotée par des petites GTPases de la superfamille Ras, les GTPases Rho qui sont elles-mêmes régulées par de nombreuses protéines capables de contrôler l'état d'activation de ces GTPases (en page 49). Dans les études réalisées sur les fibroblastes, il a été montré que l'activation des trois principales GTPases Rho induit des modifications du cytosquelette d'actine (Ridley and Hall 1992; Ridley and Hall 1992). L'activation de Cdc42 induit la formation de longs prolongements cytoplasmiques fins, les filopodes, ainsi que la formation de podosomes (Tatin, Varon et al. 2006), des microdomaines d'adhérence formés au niveau de la membrane plasmique. L'activation de Rac1 induit des protrusions cytoplasmiques larges appelées lamellipodes (retrouvées à l'avant des cellules en cours de migration) (Ridley, Paterson et al. 1992) et des ondulations membranaires appelées « ruffles ». Enfin, l'activation de RhoA produit des fibres contractiles d'actine/myosine appelées fibres de stress ou fibres de tension, ainsi que des points d'ancrage de celles-ci à la membrane, les plaques d'adhésions focales (Nobes and Hall 1995).

### ***1) La nucléation et l'élongation des filaments***

Les acteurs majeurs de la nucléation et de l'élongation des filaments d'actine sont le complexe Arp2/3 (Actin-related protein 2/3) et les formines (Millard, Sharp et al. 2004).

#### ***(a) Le complexe Arp2/3***

Le complexe Arp2/3 est très conservé chez les eucaryotes. Il est composé de sept sous-unités, dont Arp2 et Arp3. Le complexe se fixe sur un filament mère à un angle de 70° et permet la formation d'un nouveau filament, créant ainsi un réseau branché (Figure 4) (Mullins and Pollard 1999). Lorsqu'il est activé par ses régulateurs, le complexe Arp2/3 permet l'assemblage de l'actine à l'extrémité barbue du filament. Les protéines Arp2 et Arp3 agissent comme premiers monomères du filament. Les monomères d'actine sont ensuite incorporés à l'extrémité barbue. Le complexe reste donc attaché à l'extrémité pointue et l'extrémité barbue peut croître.



**Figure 4 : Nucléation des filaments d'actine par le complexe Arp2/3..**

**La nucléation peut survenir d'elle-même ou sur un filament déjà existant. Dans ce cas-ci la synthèse du nouveau filament est toujours à un angle de 70°.**

### ***(b) Les formines***

Les formines forment une deuxième famille de facteurs de nucléation. Ceux-ci catalysent la nucléation de nouveaux filaments grâce à leurs domaines FH2 (Formin Homology 2) pouvant lier les monomères d'actine (Ahuja, Pinyol et al. 2007). Ils donnent lieu à des filaments droits dépourvus d'embranchement. Il est à remarquer que le potentiel de nucléation des différentes formines varie beaucoup entre elles et elles peuvent même dans certains cas induire la dépolymérisation de l'actine ou l'assemblage de faisceaux d'actine (Chhabra and Higgs 2007).

### ***(c) Les facteurs Spire***

Les facteurs de nucléation Spire forment une troisième famille de facteurs de nucléation (Renault, Bugyi et al. 2008). A l'instar des formines, ils forment des filaments d'actine droits dépourvus d'embranchement grâce à leurs quatre domaines WH2 (Wiskott-Aldrich syndrome Homology region 2) (Quinlan, Heuser et al. 2005). Ainsi, les formines et les protéines Spire donnent lieu à un réseau de filaments d'actine droits.

## ***2) Un processus régulé de près***

La régulation des processus de nucléation et d'élongation des filaments d'actine se fait majoritairement par l'intermédiaire des GTPases Rho (principalement Cdc42, Rac1 et RhoA) (Figure 5).

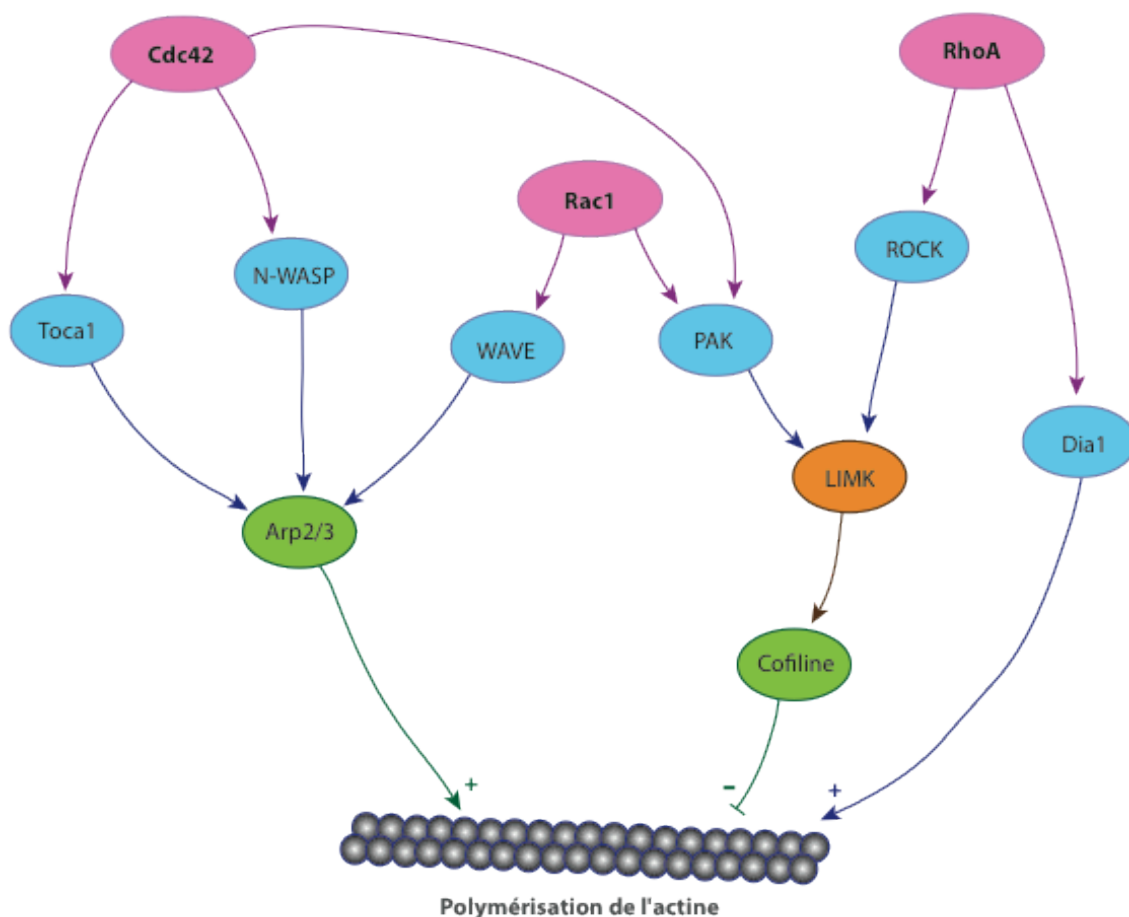
-Cdc42 active Arp2/3 via au moins deux effecteurs N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich

Syndrome Protein) (Rohatgi, Ma et al. 1999) et Toca-1 (Transducer of Cdc42 dependant actin assembly) (Ho, Rohatgi et al. 2004).

-Rac1 induit l'activation du complexe Arp2/3 via les protéines WAVE (WASP family Verpolin-homologous) (Takenawa and Miki 2001; Suetsugu, Kurisu et al. 2006).

-RhoA intervient dans les phases de nucléation et d'élongation des filaments d'actine en activant son effecteur Dia1 (Diaphanous formin 1) (Zigmond 2004).

Les GTPases Rho peuvent aussi intervenir au niveau de la stabilisation des filaments d'actine en induisant l'inhibition par phosphorylation de la Cofiline, une protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité pointue (Bamburg, McGough et al. 1999). La kinase responsable de cette inhibition, la LIMK (Lin11, Isl1, Mec3 Kinase), peut être activée par ROCK (Rho dependent kinase) (Ohashi, Nagata et al. 2000) et/ou PAK (Serine/threonine-protein kinase) (Edwards, Sanders et al. 1999).



**Figure 5 : Le réseau de régulation de la polymérisation de l'actine.**  
Les GTPases Cdc42, Rac1 et RhoA (en rose) sont au cœur de la régulation du réseau en activant des effecteurs (en bleu).

## II . La phagocytose des corps apoptotiques

### A . L'apoptose ou mort cellulaire programmée

#### 1) Définition

La mort cellulaire a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés. Le terme apoptose, du grec : *apo* - au loin et *ptosis* - chute (faisant référence à la chute des feuilles en automne) a été utilisé pour la première fois en 1972 pour décrire un certain mode de mort cellulaire responsable de la perte de cellules dans les tissus sains (Kerr, Wyllie et al. 1972). Ces cellules mourantes démontrent des caractéristiques morphologiques communes, et distinctes de celles observées dans les cellules mourant accidentellement par nécrose. L'existence d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire a ainsi été suggérée.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif par lequel les cellules indésirables ou inutiles prennent part à leur propre destruction. Cette mort physiologique, génétiquement programmée, est nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires (Wyllie, Kerr et al. 1980).

#### 2) Fonction physiologique

L'apoptose a un rôle essentiel dans le développement des organismes, animaux ou végétaux. Certaines cellules sont éliminées et participent ainsi à la morphologie des organes ou à la formation des connections nerveuses ou sanguines correctes (Vaux and Korsmeyer 1999). Parmi les défauts morphologiques dus à une déficience de l'apoptose au cours du développement, on peut citer les doigts collés ou palmés ou encore le maintien d'une queue rudimentaire chez l'homme.

L'apoptose intervient également dans l'élimination des cellules endommagées de façon irréversible par des facteurs de stress, des dommages à l'ADN ou un virus par exemple. Le suicide de la cellule est alors un moyen de protéger l'organisme.

Le renouvellement tissulaire correct est maintenu par un équilibre entre apoptose et division cellulaire. Les cellules devenant moins efficaces et perdant leur capacité à remplir leur fonction sont éliminées par apoptose alors qu'en parallèle des cellules souches se divisent pour compenser la perte (Raff 1992).

L'apoptose a un rôle central dans le système immunitaire à la fois pour éliminer les cellules auto-réactives mais aussi pour mettre fin à la réponse immunitaire. Les lymphocytes auto-réactifs dans le thymus, la moelle osseuse ou en périphérie sont éliminés par apoptose. De même, les lymphocytes T auxiliaires, responsables de l'activation des lymphocytes effecteurs T et B, sont éliminés par apoptose en fin d'inflammation (Janeway 2001).

## **B . L'élimination des corps apoptotiques**

### ***1) La phagocytose***

L'immunité innée a été découverte, dans un premier temps, à travers un processus appelé phagocytose. Un immunologiste Russe, Elie Metchnikoff, a découvert en 1905 que de nombreux organismes pouvaient être internalisés et digérés par des cellules phagocytaires qu'il appela macrophages. Toutes les cellules de l'organisme semblent être capables de phagocytose, mais certaines, particulièrement efficaces, sont appelées phagocytes professionnels. Les phagocytes professionnels connus actuellement sont de trois types, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques dont un rôle essentiel est la différenciation en cellules présentatrices d'antigène et les macrophages d'une capacité de phagocytose élevée mais pouvant aussi devenir une cellule présentatrice d'antigène.

La phagocytose est le mécanisme qui sert à internaliser et dégrader des microorganismes, des débris cellulaires ou des particules diverses (Aderem 2003; Niedergang and Chavrier 2004). Elle est définie en trois étapes : la reconnaissance de la cible, son internalisation et sa destruction (Figure 6) (Janeway 2001). La reconnaissance de la cible déclenche des voies de signalisation cellulaire aboutissant, notamment, à la modification du cytosquelette. L'actine corticale (réseau sous membranaire) se réorganise sous l'effet de l'agrégation des récepteurs phagocytaires au site de contact avec la cible. Il se forme des extensions cellulaires appelées pseudopodes qui viennent recouvrir la cible selon un mécanisme de fermeture éclair. Au fur et à mesure de l'extension des pseudopodes, les récepteurs membranaires reconnaissent les molécules à la surface de la cible entraînant ainsi une nouvelle modification du cytosquelette. Les pseudopodes s'étendent alors de plus en plus jusqu'à recouvrir totalement la cible. La dernière étape est la fusion membranaire qui aboutit à la formation d'une large vésicule intracellulaire : le phagosome.

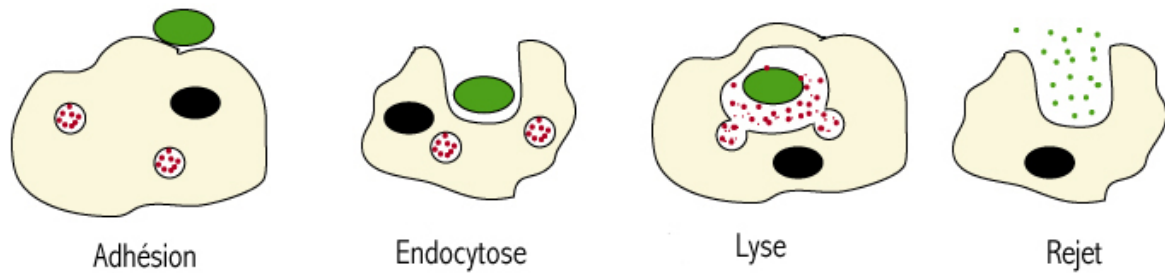


Figure 6 : Les étapes de la phagocytose.

Ce phagosome fusionne alors avec une autre vésicule intracellulaire : le lysosome pour donner un phagolysosome. Le pH dans le lysosome est très bas et il contient des enzymes lytiques. Il possède également, dans les phagocytes professionnels et particulièrement dans les polynucléaires neutrophiles, une protéine membranaire appelée NADPH oxydase. Celle-ci est capable de produire de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  mais aussi d'autres dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). L'ensemble de ces éléments va permettre la destruction de la cible dans le phagolysosome, limitant ainsi le relargage de substances hautement toxiques ou immunogènes dans le milieu ou dans la cellule. Cette dégradation va ensuite induire la présentation d'antigènes dérivés et la sécrétion de cytokines qui participent à l'activation du système immunitaire.

## **2) La phagocytose des corps apoptotiques**

### **(a) Généralités**

Des cellules libres en train de mourir sont rarement observées dans les tissus. Pourtant chaque jour des millions de cellules meurent par apoptose, mais ce processus passe inaperçu du fait de l'élimination rapide des corps apoptotiques. Cette élimination rapide et efficace explique en partie le fait que l'apoptose n'ait été que tardivement identifiée comme un  v nement physiologique fréquent.

Les changements morphologiques et biochimiques de l'apoptose ont été le sujet d'études très approfondies : les acteurs moléculaires, les voies de signalisation et les mécanismes de résistance du programme de mort cellulaire sont de mieux en mieux compris. A l'inverse, les mécanismes impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques n'ont été étudiés que plus récemment et sont encore loin d'être bien compris.

*In vitro*, les cellules en apoptose atteignent une étape très peu observée *in vivo* : la nécrose secondaire, caractérisée par une rupture de l'intégrité membranaire. Cette nécrose secondaire mène quant à elle   la libération et à l'exposition inappropriées des constituants

intra-cellulaires aux tissus adjacents, et doit donc être à tout prix évitée *in vivo* (Savill 1997), (Kono and Rock 2008). Dans l'organisme, les cellules apoptotiques sont éliminées avant d'atteindre ce stade (van Nieuwenhuijze, van Lopik et al. 2003). Cette élimination est assurée par les cellules environnantes et les cellules du système immunitaire inné qui phagocytent ces « déchets cellulaires » de façon silencieuse, c'est à dire sans alerter les défenses immunitaires. L'importance de ce processus dans l'équilibre immunitaire de l'organisme est soulignée par les conséquences dramatiques d'un défaut d'élimination de ces cellules comme certaines maladies auto-immunes humaines telles que le Lupus Erythémateux Systémique (Fadok and Chimini 2001; Henson, Bratton et al. 2001; Franc 2002; Savill, Dransfield et al. 2002; Viorritto, Nikolov et al. 2007; Elliott, Zheng et al. 2010). Cette étape de phagocytose « silencieuse » est essentielle à l'homéostasie immunitaire de l'organisme.

## **(b) Mécanisme**

### **(i) Signaux « mangez-moi » et reconnaissance**

La discrimination entre cellules apoptotiques et cellules viables par les phagocytes a lieu avant la lyse de la cellule, et implique des modifications de surface précoces parmi lesquelles certaines agissent comme des signaux « mangez-moi » (Figure 7). Le changement le mieux caractérisé de la membrane plasmique au cours de l'apoptose est la perte de l'asymétrie membranaire et l'exposition de phosphatidylsérine sur le feuillet externe (Fadok, Savill et al. 1992; Fadok, Voelker et al. 1992; Fadok, Bratton et al. 1998; Fadok and Chimini 2001). Une autre propriété de surface modifiée est la nature des glycosylations. Les oligosaccharides présents à la surface des cellules viables sont sialylés. Les acides sialiques sont caractérisés par une charge nette négative et ils ont un rôle essentiel dans l'inhibition du complément ou dans les interactions cellulaires. Les cellules apoptotiques perdent l'acide sialique terminal exposant ainsi les résidus sous-jacents galactose et N-acétylglucosamine par exemple. D'autres modifications peuvent être présentes comme la modification de l'oxydation des lipides membranaires, l'exposition de nucléosomes ou l'augmentation de la quantité de calréticuline (récepteur de C1q) de surface. Sur les cellules viables, il existe des signaux « don't eat-me » qui repoussent les phagocytes. Ces signaux sont diminués ou redistribués au cours de l'apoptose (Gardai, McPhillips et al. 2005; Païdassi, Tacnet-Delorme et al. 2008).

De nombreux récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Savill and Fadok 2000). La reconnaissance de la phosphatidylsérine exposée au cours de l'apoptose est le système mis en jeu dans l'élimination des cellules apoptotiques le mieux caractérisé jusqu'ici (Fadok, Bratton et al. 1998). Cette reconnaissance peut se faire via

des molécules de pontage solubles (comme C1q et MFG-E8 (Milk-Fat-Globule-EGF-factor8)), qui peuvent se fixer à la phosphatidylsérine puis être à leur tour reconnues par des récepteurs à la surface des phagocytes. Mais la reconnaissance de la phosphatidylsérine peut aussi se faire de manière directe grâce à des récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes. De nombreux autres récepteurs phagocytaires et molécules de pontage ont été mis en évidence, sans que la nature précise des ligands qu'ils reconnaissent à la surface cellulaire ne soit forcément connue. Le nombre et la nature des récepteurs et des signaux impliqués peut varier d'un couple cellule apoptotique/phagocyte à l'autre (Lauber, Blumenthal et al. 2004; Elliott, Zheng et al. 2010).

## (ii) Internalisation et élimination silencieuse

A la différence d'une phagocytose de corps étrangers, la phagocytose d'une cellule apoptotique doit être silencieuse. C'est-à-dire qu'elle ne doit pas entraîner de sécrétion de signaux pro-inflammatoires, mais au contraire, des signaux anti-inflammatoires. Dans un premier temps nous allons étudier les voies de signalisation impliquées dans le remodelage de l'actine puis les mécanismes de contrôle de l'état inflammatoire des phagocytes professionnels.

### • Remodelage du cytosquelette d'actine

Les mécanismes de la phagocytose des cellules apoptotiques ont été étudiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, un petit ver d'environ un millimètre de long. C'est un organisme modèle dans l'étude du développement des organismes pluricellulaires. Dans cet organisme, la phagocytose n'a lieu que pour éliminer les cellules apoptotiques.

Tout au long de cette thèse des analogies entre différentes espèces seront faites. Pour plus de clarté, un tableau mentionnant les principaux orthologues impliqués dans les voies de la phagocytose des corps apoptotiques pour chaque espèce présentée a été réalisé (Tableau I).

<i>C.elegans</i>	<i>Drosophile</i>	Mammifères
Ced-12	dElmo	Elmo
Ced-5	MBC	Dock
Ced-10	dRac	Rac1
Ced-2	dCrk	CrkII

**Tableau I : Récapitulatif des différents orthologues impliqués dans la voie de la phagocytose des corps apoptotiques.**



Chez le nématode, 7 gènes, nommés *ced* pour rappeler le terme « programmed cell death », sont impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques (Ellis, Jacobson et al. 1991). Ils appartiennent à deux voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de la petite GTPase Ced-10 impliquée dans le remodelage de l'actine. Chez les mammifères, ces mêmes voies ont été mises en évidence (Figure 7) (Grimsley and Ravichandran 2003).

Rac1 est l'orthologue de Ced-10 chez les mammifères. Comme nous l'avons vu précédemment (en page 32), Rac1 est une petite GTPase qui une fois activée permet d'initier la polymérisation de l'actine par l'intermédiaire des facteurs WAVE et Arp2/3 (Figure 5) (Takenawa and Miki 2001).

### ⇒ **La voie GULP (Ced-6)**

Les protéines Ced-1, Ced-6 et Ced-7, orthologues respectivement des récepteurs CD91, LRP1 et MGF10, de la protéine adaptatrice GULP et de la protéine transporteur ABCA1 (ATP Binding Cassette transporteur A1) chez les mammifères, forment la première voie de signalisation.

Ced-1 est un récepteur transmembranaire qui se rassemble autour des corps apoptotiques en réponse à un ligand inconnu et initierait la voie de signalisation via son domaine intracellulaire (Zhou, Caron et al. 2001). Il est fortement probable que ces signaux soient transduits via Ced-6 une protéine adaptatrice. Son orthologue GULP interagit physiquement avec Ced-1 et LRP1 (Su, Nakada-Tsukui et al. 2002). Chez la drosophile, les orthologues de Ced-1 et Ced-6 (Draper et Dced-6) jouent également un rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (Manaka, Kuraishi et al. 2004). In fine, Ced-10/Rac1 est activé (Kinchin, Cabello et al. 2005).

La protéine Ced-7 reste une énigme, car elle est unique par de nombreux aspects. Tout d'abord, c'est la seule protéine dont le fonctionnement est nécessaire à la fois dans la cellule apoptotique et dans la phagocytose (Wu and Horvitz 1998). Son rôle paraît limité dans le temps chez *C. elegans*, néanmoins, elle semble favoriser la relocalisation de Ced-1 autour de la cellule apoptotique (Ellis, Jacobson et al. 1991), (Zhou, Caron et al. 2001; Kinchen, Cabello et al. 2005). L'identité des orthologues de *ced-7* chez les mammifères est aussi controversée : ABCA1 (Luciani and Chimini 1996) et ABCA7 (Jehle, Gardai et al. 2006) ont été impliqués dans différentes études et les deux ont été impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques (Hamon, Trompier et al. 2006), (Landry, Denis et al. 2006), (Kiss, Ma et al. 2006).

⇒ **La voie Dock/Elmo (Ced-5/Ced-12)**

Les gènes *ced-2*, *ced-5* et *ced-12* homologues des gènes de mammifères codant les protéines CrkII (Cdc2 Related Kinase), Dock1 (DOWnstream of CrK) et Elmo1 (EnguLfment and cell MOtility) forment la seconde voie de signalisation.

Chez *C. elegans*, Ced-2 serait impliqué dans la relocalisation de Ced-5 et Ced-12 à la membrane plasmique de façon à activer Ced-10. Le récepteur membranaire impliqué dans cette voie n'est pas connu (Gumienny, Brugnera et al. 2001).

Chez les mammifères, les orthologues Dock1, Elmo1 et CrkII ont exactement le même comportement. Par contre, les connections entre cette voie et les récepteurs identifiés restent à préciser. Plusieurs mécanismes de recrutement de ces protéines à la membrane ont été identifiés. Dans les cellules dendritiques immatures, le recrutement de CrkII, Dock1 et Elmo1 est notamment une conséquence de l'interaction du récepteur  $\alpha\beta 5$  (récepteur des cellules dendritiques immatures) avec MFG-E8 (Albert, Kim et al. 2000). L'ensemble du complexe Dock1/Elmo est alors re-localisé à la membrane (Albert, Kim et al. 2000). Il a été montré que le récepteur BAI1, qui reconnaît la phosphatidylsérine, peut recruter le complexe Dock1/Elmo1 en interagissant directement avec Elmo1 (Park, Tosello-Tramont et al. 2007). De plus, le récepteur MER permet de déclencher l'activation de la petite GTPase RhoG (orthologue de MIG-2) par la GEF TRIO (orthologue de UNC-73). En se fixant à Elmo1, RhoG participe ainsi à la voie Dock/Elmo et augmente le taux de phagocytose (deBakker, Haney et al. 2004), (Wu, Gan et al. 2005).

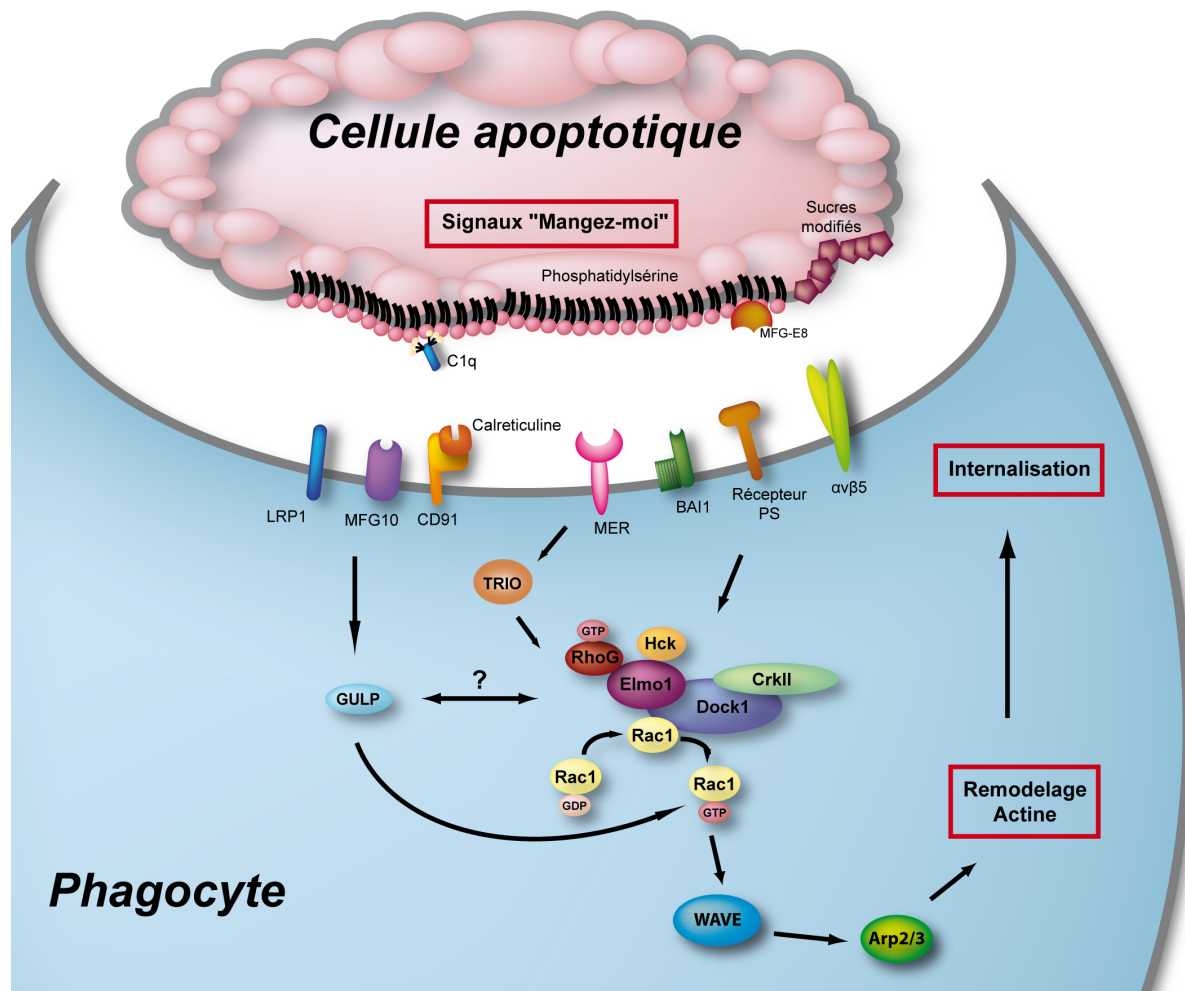


Figure 7 : Représentation schématique des molécules connues impliquées dans la signalisation de la phagocytose des cellules apoptotiques.

Deux voies distinctes ont été identifiées pour activer la GTPase Rac1 et le remodelage du cytosquelette d'actine qui mène à l'internalisation : la voie GULP et la voie Dock/Elmo.

Le complexe Dock1/Elmo chez les mammifères, tout comme le complexe Ced-5/Ced-12 chez *C.elegans*, a non seulement un rôle important dans l'élimination des corps apoptotiques mais aussi dans la migration cellulaire, deux phénomènes nécessitant le remodelage du cytosquelette d'actine (Gumienny, Brugnera et al. 2001). Il pourrait entre autre jouer un rôle clé dans la migration des phagocytes en présence de cellules apoptotiques (Lauber, Blumenthal et al. 2004). Les détails de son rôle dans la migration cellulaire seront étudiés dans une prochaine partie (en page 43).

- *Contrôle des processus inflammatoires*

- ⇒ *Élimination contrôlée des cellules inflammatoires*

Au cours de la phase aigüe de la réponse inflammatoire, de nombreux neutrophiles sont recrutés dans les tissus, où ils survivent pour une courte période avant de mourir par apoptose. Les neutrophiles apoptotiques deviennent peu susceptibles et réactifs aux stimuli externes, mais conservent l'intégrité de leur membrane plasmique ce qui permet de limiter la libération du contenu intra-cellulaire nocif (Dransfield, Stocks et al. 1995). Les neutrophiles apoptotiques sont reconnus et ingérés par les macrophages, ce qui semble être une étape clé pour prévenir la libération de granules cytotoxiques et de facteurs chimiotactiques dans le fluide extra-cellulaire, limitant ainsi la survenue de lésions supplémentaires et permettant la résolution de l'inflammation (Savill, Wyllie et al. 1989). De plus la reconnaissance et l'élimination précoce des cellules apoptotiques par les macrophages induisent une réponse anti-inflammatoire, comme cela est décrit dans le paragraphe suivant. Ainsi, en réprimant les fonctions des neutrophiles et en induisant leur phagocytose non-inflammatoire par les macrophages, l'apoptose assure l'élimination sécurisée de cellules inflammatoires potentiellement dangereuses, ce qui permet la résolution de l'inflammation.

- ⇒ *Contrôle de la réponse inflammatoire*

A l'inverse de la phagocytose des pathogènes, la phagocytose des cellules apoptotiques ne conduit pas à la production de cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré *in vitro* que les macrophages qui internalisent des cellules apoptotiques sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) et IL-10 (InterLeukine 10) (Voll, Herrmann et al. 1997; Fadok, Bratton et al. 1998; Devitt, Parker et al. 2004). De plus, la présence de cellules apoptotiques inhibe *in vitro* la production de cytokines inflammatoires (comme IL-1 et IL-12) produites par les monocytes en réponse au lipopolysaccharide (Voll, Herrmann et al. 1997). Il est suggéré que cette inhibition puisse être due à la production de TGF- $\beta$  par les phagocytes (Lucas 2006). Visiblement, les cellules apoptotiques entières ne sont pas requises pour de tels effets, des fragments de membrane apoptotique ou des vésicules avec de la phosphatidylsérine, suffiraient aux effets anti-inflammatoires (Huynh 2002).

## III . La migration cellulaire

Grâce aux différents éléments du cytosquelette la cellule peut changer de forme, se diviser ou se déplacer. L'actine, sous sa forme filamenteuse est un acteur majeur de cette dynamique. Le remodelage du cytosquelette d'actine mis en jeu lors de la migration cellulaire est contrôlé par de nombreuses voies de signalisation. Le complexe Elmo/Dock, en activant la GTPase Rac1, a été décrit comme jouant un rôle central dans ce processus cellulaire.

### A . Rôle physiologique

La migration intervient de façon fondamentale dans plusieurs processus physiologiques. Au stade embryonnaire les cellules subissent de nombreuses migrations lors de la différenciation et de la mise en place des différents tissus : c'est l'organogenèse. Des cellules sont toutefois plus spécialisées dans le déplacement comme les spermatozoïdes, en étant équipées d'organes spécifiques : les flagelles. La migration se retrouve aussi dans les processus de cicatrisation, où les cellules migrent pour restaurer un tissu endommagé et dans la vascularisation où les cellules endothéliales migrent pour former un réseau capillaire lors de l'angiogenèse (Schneider and Haugh 2006). Mais on la retrouve aussi dans les processus de l'inflammation où les leucocytes vont migrer vers les sites infectés pour détruire les bactéries.

La migration est également mise à contribution dans des processus pathologiques. La vascularisation tumorale fait appel à la migration de cellules endothéliales en réponse à des facteurs de croissance sécrétés par la tumeur. Dans le cas des métastases, les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire pour se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin (Condeelis, Singer et al. 2005). La migration est aussi mise en jeu lors de la croissance tumorale qui résulte en particulier de dérèglements de la prolifération cellulaire et du comportement migratoire des cellules.

### B . Différents mécanismes de migration

Les déplacements ainsi que leurs causes et leurs conséquences, varient suivant le type cellulaire, le stade de développement, l'environnement chimique et physique ou encore les facteurs de différenciation alentours...

Les cellules non adhérentes ont besoin d'organites comme les cils et les flagelles pour se déplacer. Dans le cas des cellules adhérentes, le mouvement a lieu grâce à la formation de pseudopodes ou de lamellipodes. Dans certains cas, les cellules ont besoin de substances (les chimiokines) pour les attirer et les diriger dans la bonne direction : c'est le chimiotactisme. D'autres cellules bougent sans être attirées chimiquement. Les spermatozoïdes sont dirigés grâce à des substances propres à chaque espèce. Ces substances chimiques auraient d'autres conséquences que l'attraction du spermatozoïde : elles activeraient le flagelle pour accélérer son mouvement. La nature de ces substances chimiques ainsi que leur action directe sur le métabolisme du spermatozoïde sont clairement identifiées chez des modèles animaux comme l'oursin, mais restent encore mal connues chez l'homme.

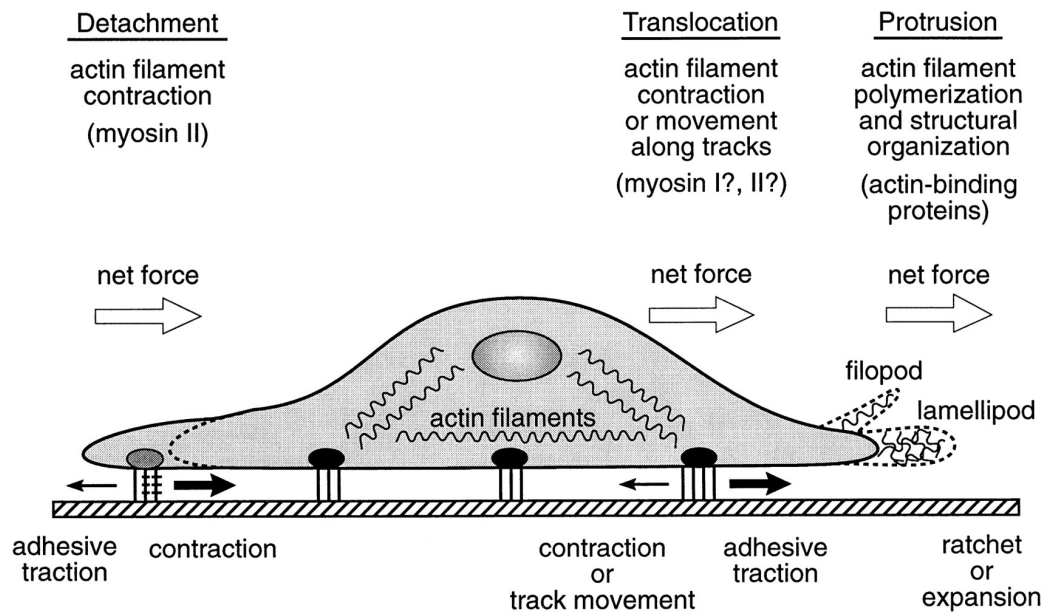
Les cellules embryonnaires ou bien les fibroblastes par exemple, se servent de leur support pour aller vers les cellules qui les attirent par chimiotactisme. Ces mouvements sont possibles grâce, entre autre, à la succession de polymérisation et de dépolymérisation des molécules d'actine. En général la cellule avance en défaisant des points de jonction en arrière et en en créant de nouveaux à l'avant de son mouvement, c'est un processus dynamique.

Pour d'autres cellules, comme les leucocytes, le mouvement est possible grâce à la suppression de l'adhésion des cellules au support : les jonctions des cellules à la matrice extracellulaire sont supprimées. Une fois arrivées à leur but, des cellules comme les leucocytes établissent de nouvelles jonctions cellulaires avec la matrice de l'endroit où elles se trouvent. Ce genre de phénomène a surtout lieu au moment de l'organogenèse.

Le développement d'un cancer peut amener les cellules à acquérir une certaine motilité. Le caractère métastatique d'une cellule se caractérise, entre autres, par la perte de contact intercellulaire et par l'acquisition de la mobilité.

## **C . Les grandes étapes de la migration**

Le mécanisme de migration cellulaire est généralement divisé en cinq étapes majeures : (i) polarisation dans l'axe de migration, (ii) formation de protrusions membranaires au front de migration, (iii) adhésion à la matrice extracellulaire, (iv) contraction du corps cellulaire et finalement (v) désassemblage des sites d'adhésion focale à l'arrière de la cellule pour permettre un mouvement net vers l'avant (Figure 8) ((Bourmeyster and Vignais 1996; Lauffenburger and Horwitz 1996).



**Figure 8 : Migration cellulaire.**

La formation des protrusions de la membrane requiert des forces générées par la polymérisation du cytosquelette d'actine. La création de nouvelles adhérences vers l'avant et la dissociation de celles « en arrière » permettent à la cellule d'avancer. D'après (Lauffenburger and Horwitz 1996)

### ***1) Polarisation***

Afin de permettre un mouvement net dans une direction donnée, la cellule doit dans un premier temps se polariser. Ceci se traduit, par la formation du front de migration et par la redistribution asymétrique des récepteurs chémosensoriels, des intégrines et autres récepteurs de la matrice extracellulaire, ainsi que de plusieurs molécules du cytosquelette (Sullivan, Daukas et al. 1984; Schmidt, Horwitz et al. 1993; Lawson and Maxfield 1995). De plus il y a une relocalisation des filaments d'actine du cortex cellulaire vers le front de migration (Coates, Watts et al. 1992).

### ***2) Formation de protrusions***

Une fois polarisée, la cellule génère la force motrice nécessaire pour projeter la membrane vers l'avant en polymérisant rapidement des filaments d'actine au front de migration (Carson, Weber et al. 1986; Borisy and Svitkina 2000). Ces filaments déforment la membrane et donnent lieu à différentes formes de protrusions dont les plus répandues et les mieux caractérisées sont les lamellipodes et les filopodes (Figure 8). Les premières sont des extensions larges et minces de la membrane qui ont l'aspect d'une feuille de papier et sont composées d'un lacis de filaments d'actine droits et parallèles. Dans la régulation des processus d'invasion, comme dans la réponse immunitaire innée via les macrophages, ces structures membranaires sont appelées podosomes (Gimona, Buccione et al. 2008). Toutes ces structures sont riches en actine et en protéines associées au cytosquelette.



### ***3) Adhésion***

La formation de sites d'adhésions focale au front de migration est nécessaire pour stabiliser la protrusion et fournir à la cellule la force de traction nécessaire pour déplacer le corps cellulaire (Figure 8) (Palecek, Loftus et al. 1997; Beningo, Dembo et al. 2001). Ainsi, lorsque la membrane s'étend et qu'elle entre en contact avec la matrice extracellulaire, elle se stabilise en formant rapidement de nouveaux sites d'adhésion (Lee, Leonard et al. 1994; Galbraith and Sheetz 1997; Palecek, Loftus et al. 1997; Oliver, Dembo et al. 1999; Beningo, Dembo et al. 2001). Bien que plusieurs familles de récepteurs soient impliquées dans la migration, les intégrines sont une classe majeure de récepteurs pro-migratoires et servent de point d'ancrage en reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine (Palecek, Loftus et al. 1997). L'engagement et l'agrégation des intégrines sont suffisants et nécessaires pour recruter plusieurs composantes des sites d'adhésion focale telle que les protéines Src et FAK (Miyamoto, Akiyama et al. 1995; Miyamoto, Teramoto et al. 1995).

Une fois formés, les sites d'adhésion focale immatures, aussi appelés complexes focaux (Broussard, Webb et al. 2008), vont en grande majorité être recyclés pour former de nouveaux sites d'adhésion, alors que certains vont perdurer et atteindre leur maturité à l'arrière du front de migration en réponse aux fibres de stress (Bershadsky, Balaban et al. 2003). Les sites d'adhésion focale matures peuvent être désassemblés à leur tour dans la région périnucléaire ou être transformés en adhésions fibrillaires (Rid, Schiefermeier et al. 2005).

### ***4) Contraction***

Afin de se déplacer, une cellule doit être en mesure de générer une force de contraction qui va lui permettre de déplacer le corps cellulaire vers l'avant. Les sites d'adhésion au front de migration et à l'arrière de la cellule sont ceux qui subissent les plus fortes contractions (Beningo, Dembo et al. 2001). Ces forces sont générées par l'interaction entre les filaments d'actine attachés aux sites d'adhésion et la myosine II (Figure 8) (Jay, Pham et al. 1995).

### ***5) Désassemblage des sites d'adhésion***

Les sites d'adhésion à l'arrière de la cellule doivent être désassemblés afin de rétracter cette région. Il est à noter que les mécanismes moléculaires régissant le recyclage des sites d'adhésion immature au front de migration et le désassemblage des sites d'adhésions matures à l'arrière divergent l'un de l'autre (Webb, Parsons et al. 2002). Le mécanisme de scission entre les intégrines et le cytosquelette est encore mal compris, mais il a été démontré que les



forces de contraction ainsi que l'activité tyrosine kinase en général sont nécessaires pour détacher l'arrière d'une cellule (Crowley and Horwitz 1995).

## D . Les bases moléculaires

Le déplacement naît de la combinaison entre la polymérisation dynamique de l'actine à l'avant et la contraction de l'arrière d'une cellule. Dans l'organisme, la migration est orientée et les stimuli externes contribuent à la polariser. Comme mentionné en page 31, Rac1 agit via son effecteur WAVE qui active le complexe Arp2/3, afin de faire évoluer le front de migration en le modelant (Figure 5).

Le complexe Elmo/Dock recruté à la membrane permet d'activer Rac1 qui s'accumule à l'avant de la cellule (Reddien and Horvitz 2004; Cote and Vuori 2007). Ce mécanisme serait soutenu par une rétroaction positive, mettant en jeu PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) et PIP3 (Phosphatidyl inositol (3,4,5) triphosphate), cependant les mécanismes exacts ne sont pas encore connus (Kraynov, Chamberlain et al. 2000; Itoh, Kurokawa et al. 2002).

En revanche, sur les côtés et l'arrière de la cellule, PIP3 est déphosphorylée par la PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), (Merlot and Firtel 2003). Le choix de la direction de la cellule semble toutefois assuré par Cdc42, étant donné que l'inhibition de celle-ci dans les macrophages rend le mouvement anarchique (Allen, Zicha et al. 1998). Cette GTPase, une fois activée, apparaît aussi essentielle au confinement de Rac1 au front de migration (Cau and Hall 2005) .

Chez *D.discoideum*, ces mécanismes sont mieux connus. Des signaux de chimiotactisme reçus par des récepteurs de la famille des GPCR sont transduits par les sous-unités G $\beta\gamma$  libérées de la protéine G hétérotrimérique, en formant un complexe avec ElmoE (l'orthologue de Elmo). ElmoE interagit ensuite avec Dock pour activer la GTPase Rac et ainsi activer la nucléation de l'actine via le complexe Arp2/3 à l'avant de la cellule (Figure 9) (Yan and Jin 2012; Yan, Mihaylov et al. 2012).

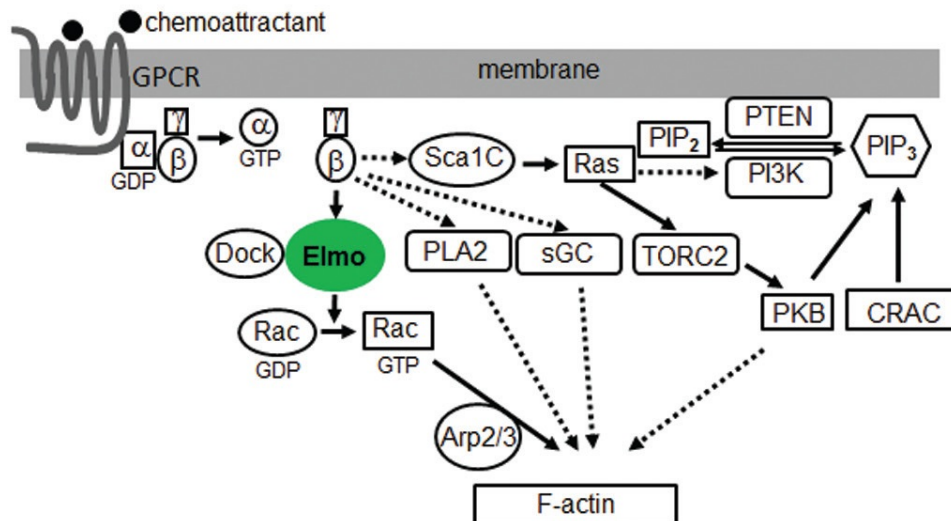


Figure 9 : Modèle de la voie de signalisation du chimiotactisme chez *D. discoideum*.

Le signal reçu par les GPCR est transduit jusqu'au cytosquelette d'actine par le biais du complexe Elmo/Dock. Les flèches pleines indiquent une association et celles en pointillés indiquent un manque de données concernant l'association (Yan and Jin 2012).

## IV . Les GTPases Rho

Comme nous l'avons vu précédemment, les voies de signalisation contrôlant la dynamique du cytosquelette d'actine sont essentiellement basées sur les GTPases Rho qui agissent comme des interrupteurs moléculaires (Figure 5). Ces petites molécules nécessitent d'être régulées de façon très précise, nous allons détailler ici leur mécanisme d'action et leurs différents régulateurs.

### A . Généralités

Les GTPases Rho (Ras homologous) appartiennent à la superfamille des petites protéines G monomériques Ras (Rat Sarcoma). Cette superfamille compte plus de 150 membres qui sont fortement conservés chez tous les eucaryotes. Ces protéines lient les nucléotides guanidiques, GDP et GTP (Takai, Sasaki et al. 2001; Hall 2005). Elles possèdent une activité GTPasique permettant l'hydrolyse du GTP. La superfamille Ras est organisée en cinq familles (Bar-Sagi and Hall 2000; Matozaki, Nakanishi et al. 2000) :

-**Ras** : impliquée dans la régulation de l'expression génique, de la prolifération, de la différenciation, de la morphologie et de l'apoptose.

-**Rab** (Ras-related in brain) : régulant le trafic vésiculaire intracellulaire.

-**Ran** (Ras-related Nuclear protein): impliquée dans le transport nucléaire durant l'interphase et la mitose.

-**Arf** (ADP ribosylation factor) : contrôlant notamment le bourgeonnement des vésicules au niveau du trafic intracellulaire et l'organisation des microtubules lors de la mitose.

-**Rho** : fonctionnant comme des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire, que nous allons ici détailler.

Les GTPases Rho ont un faible poids moléculaire (entre 20 et 30 kDa) et présentent entre 30 et 50% d'identité de séquence en acides aminés avec les GTPases Ras (Cotteret and Chernoff 2002; Wennerberg and Der 2004). Chez les mammifères, on dénombre 22 gènes codant pour 25 protéines de la famille Rho (Wherlock and Mellor 2002; Wennerberg and Der

2004). Ces différents membres sont classés en sept sous-familles sur la base de leur séquence primaire, qui ont des propriétés similaires mais pas identiques. Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'organisation du cytosquelette, l'expression de gènes, la prolifération cellulaire ou encore le trafic vésiculaire. Dans cet exposé nous nous focaliserons principalement sur la GTPase Rac1 qui joue un rôle important dans le remodelage du cytosquelette d'actine lors de la phagocytose des corps apoptotiques et de la motilité cellulaire.

## B . Structure

Au niveau structural, les GTPases Rho partagent avec les autres petites protéines G un domaine caractéristique, le domaine G (pour GTPase), avec un repliement globulaire et des motifs G conservés (Figure 10, Figure 11). Ce domaine assure la liaison aux nucléotides guanidiques (Geyer and Wittinghofer 1997). De plus, les GTPases Rho possèdent deux autres régions caractéristiques des petites protéines G : les régions switch I et switch II, qui sont impliquées dans l'interaction avec leurs régulateurs et leurs effecteurs (Wennerberg and Der 2004; Wheeler and Ridley 2004). La majorité des GTPases Rho présentent aussi à leur extrémité C-terminale une séquence spécifique, sujette à des modifications post-traductionnelles par des isoprényltransférases (Wennerberg, Rossman et al. 2005). Ces modifications lipidiques C-terminales des GTPases Rho sont essentielles à leur localisation subcellulaire au niveau de membranes spécifiques à leur interaction avec les effecteurs (Wennerberg and Der 2004).

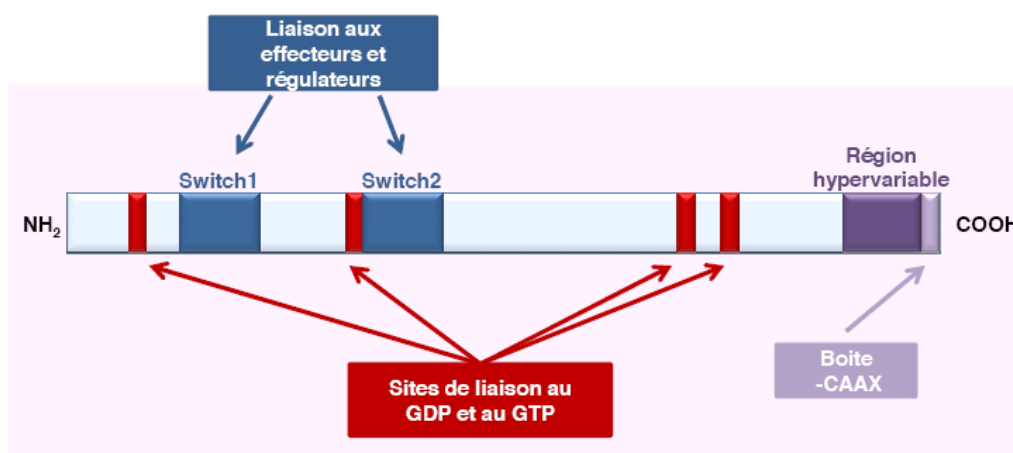
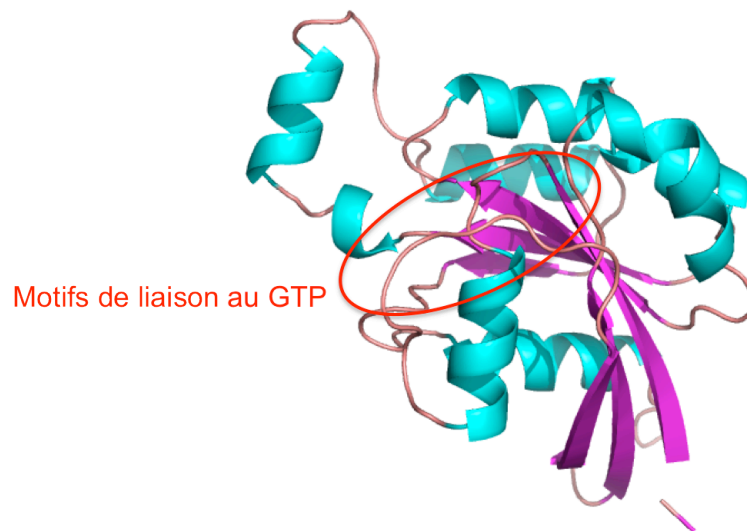


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation des GTPases Rho.



**Figure 11 : Structure cristalline de la GTPase Rac1.**  
Code PDB 1MH1 (Hirshberg, Stockley et al. 1997).

## C . Cycle d'activation des GTPases Rho

Comme la plupart des petites protéines G, les GTPases Rho se comportent comme des interrupteurs moléculaires capables d'osciller entre un état inactif ou « off » (lié au GDP) et un état actif ou « on » (lié au GTP) (Paduch, Jeleń et al. 2001; Wennerberg and Der 2004). Cette caractéristique est la conséquence d'un cycle moléculaire GDP/GTP (Figure 12) faisant intervenir des molécules régulatrices fondamentales dans la biologie des GTPases, les facteurs d'échange de guanine (GEF) et les protéines activatrices de GTPases (GAP) (Cherfils and Chardin 1999; Rossman, Der et al. 2005; Bos, Rehmann et al. 2007). En dehors de ce cycle, il existe une autre classe de régulateurs des petites protéines G, les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDI) (Fukumoto, Kaibuchi et al. 1990).

L'activation des GTPases Rho est déclenchée en réponse à divers signaux extracellulaires, comme l'engagement des intégrines, l'activation du TCR ou le déclenchement de la phagocytose (Price, Sewell et al. 1998; Bar-Sagi and Hall 2000; Burridge and Wennerberg 2004). Dans leur état actif, liées au GTP, les GTPases Rho sont capables d'interagir et d'activer de nombreuses protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, elles sont désignées sous le terme d'effecteurs. Les effecteurs de ces protéines sont extrêmement variés et les placent ainsi au cœur de la régulation de nombreuses fonctions biologiques (Ridley 2001).

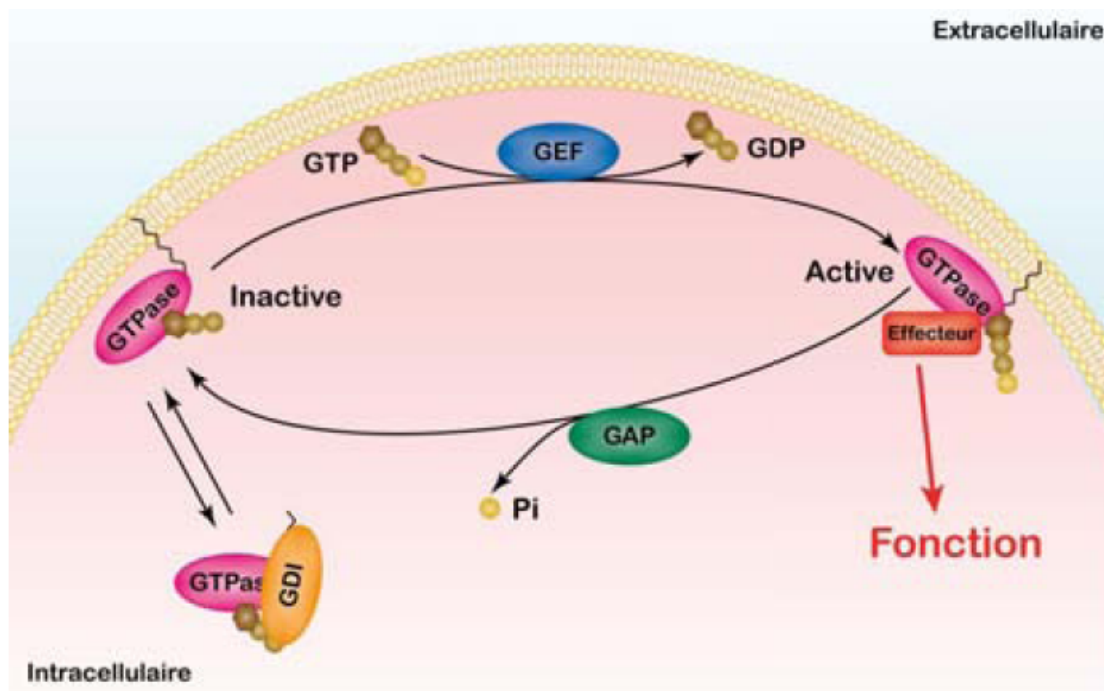


Figure 12 : Régulation de l'activité des GTPases Rho.

Les GTPases Rho existent sous deux formes, une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Le passage de l'une à l'autre de ces formes est régulé par deux classes de protéines, les GEFs et les GAPs. Les GEFs sont des protéines qui catalysent l'échange du GDP par le GTP, favorisant le passage vers la forme activée de la GTPase. Les GAPs sont des protéines qui augmentent l'activité GTPasique, favorisant la forme inactive de la GTPase. En outre, une autre classe de régulateur intervient en marge du cycle GDP/GTP, les GDIs, ce sont des protéines qui séquestrent les GTPases sous forme GDP dans le cytosol. L'activité de l'ensemble de ces protéines (GEFs, GAPs et GDIs) est régulée par divers signaux.

### ***1) Les facteurs d'échange de Guanine (GEF)***

L'activité intrinsèque d'échange du GDP en GTP des GTPases Rho est favorisée et accélérée par les GEF (Vetter and Wittinghofer 2001; Rossman, Der et al. 2005; Bos, Rehmann et al. 2007). Ces derniers interagissent avec les GTPases Rho sous leur conformation inactive liée au GDP et en permettent la dissociation (Cherfils and Chardin 1999). De plus, les GEF stabilisent l'état dans lequel les GTPases Rho ne sont pas liées aux nucléotides guanidiques, et qui précèdent la fixation du GTP présent en plus grande quantité dans les cellules (Cerione and Zheng 1996; Bos, Rehmann et al. 2007). Plus de 80 GEFs des GTPases Rho (ou Rho GEFs) ont été dénombrés, plus nombreux que les GTPases, ils sont aussi souvent plus spécifiques du signal d'activation en amont et dirigent donc la réponse biologique en activant la ou les GTPase(s) spécifique(s) requise(s) (Wheeler and Ridley 2004; Hall 2005; Rossman, Der et al. 2005). Ainsi, certains GEFs ont une activité de facteur d'échange envers plusieurs membres de la famille des GTPases Rho, alors que d'autres sont plus spécifiques. Les Rho GEFs comportent deux familles principales dont le mécanisme de fonctionnement est différent : la famille Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma) et la famille Dock1.

**(a) Les GEFs de la famille Dbl**

Dbl a été la première GEF activant les GTPases de la famille Rho à être découverte chez les mammifères. La famille Dbl contient plus de 70 membres, ce sont des protéines multidomaines qui présentent une région d'environ 300 résidus formant un tandem structural composé d'un domaine Dbl-Homology (DH) d'environ 200 résidus et d'un domaine Plekstrin-Homology (PH) d'une centaine de résidus (Cerione and Zheng 1996), (Rossman, Der et al. 2005).

Ce tandem structural DH-PH possède *in vitro* une activité GEF supérieure au domaine DH seul ce qui montre l'importance du domaine PH dans la promotion de l'activité GEF (Rossman and Campbell 2000). Le domaine DH, interagit principalement avec la région Switch II des GTPases Rho (Aghazadeh, Zhu et al. 1998; Worthylake, Rossman et al. 2000). Au niveau structural, le domaine DH est constitué d'une dizaine d'hélices  $\alpha$  formant la zone d'interaction avec la GTPase.

Le rôle du domaine PH dans la biologie des GEF n'est pas totalement élucidé, mais nous savons qu'il participe à la localisation membranaire des protéines Dbl par ses interactions avec les Phosphoinositides (Han 1998). Il joue aussi un rôle dans l'activité GEF, soit directement en interagissant avec la GTPase (Rossman, Worthylake et al. 2002; Kristelly, Gao et al. 2004), soit indirectement en favorisant l'intervention d'autres régulateurs tels que les Phosphoinositides (Russo, Gao et al. 2001) ou des membres de la famille ERM (Ezrin Radixin Moesin) comme l'Ezrine qui connecte le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Vanni, Parodi et al. 2004).

L'activité des GEFs peut être régulée par des processus impliquant d'autres parties de la protéine tels que des phosphorylations et/ou des changements de localisation subcellulaire, ou localisation membranaire (Crespo, Schuebel et al. 1997; Hall, Bar-Sagi et al. 2002).

**(b) Les GEFs de la famille de Dock1**

Les GEFs de la famille Dock1, (aussi nommée Dock180), ne possèdent pas de module DH-PH, le mécanisme de leur activité GEF fait intervenir un autre domaine : le Dock1-Homology-Region-2 (DHR2) (Cote and Vuori 2002). Ce domaine d'environ 500 résidus est parfois suffisant pour l'activité GEF bien qu'il ne présente pas d'homologie de séquence ni de structure avec le module DH-PH (Brugnera, Haney et al. 2002; Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2002; Yang, Zhang et al. 2009). Les GEFs de la famille de Dock1 seront étudiées plus en détail dans le chapitre suivant (en page 57).

## ***2) Les autres régulateurs des GTPases Rho***

### ***(a) Les protéines activatrices de GTPases (GAP)***

A ce jour, au moins 80 GAPs des GTPases Rho (ou RhoGAPs) sont connues (Bernards and Settleman 2004). Ces protéines sont capables d'augmenter l'activité GTPasique, par ailleurs faible, des GTPases Rho. L'activité GAP est principalement due à un domaine conservé de 140 résidus, le domaine RhoGAP, qui diffère de celui des GAPs des autres petites GTPases (Ras, Ran et Arf), mais dont la structure tertiaire est très proche (Zheng, Hart et al. 1993). Tout comme les RhoGEFs, les RhoGAPs forment une famille très hétérogène, dont les membres présentent de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine (SH2, SH3, polyproline motif) et protéine-phospholipides (PH, C2 (Protein kinase C conserved region 2), BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) (Bernards and Settleman 2004).

Du fait de leur hétérogénéité structurale, la régulation des Rho GAPs peut se faire par plusieurs mécanismes. L'activité GAP et la localisation cellulaire peuvent être régulées par phosphorylation (Minoshima, Kawashima et al. 2003; Moskwa, Paclet et al. 2005), interaction avec des phospholipides, ou par dégradation protéique (Bernards and Settleman 2004). La spécificité des RhoGAPs a été étudiée *in vitro*, et comme pour les GEFs, on trouve beaucoup de redondance (Moon et Zheng 2003), mais la spécificité *in vivo* semble être beaucoup plus réduite (Sekimata, Kabuyama et al. 1999; Taylor, Macklem et al. 1999).

### ***(b) Les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDI)***

La dernière classe de régulateurs des GTPases Rho est la classe des Rho-GDIs. On connaît actuellement trois GDIs : RhoGDI  $\alpha$  (Fukumoto, Kaibuchi et al. 1990), RhoGDI  $\beta$  (Scherle, Behrens et al. 1993) et RhoGDI  $\gamma$  (Adra, Manor et al. 1997). Les Rho-GDIs sont des régulateurs négatifs de l'activation des GTPases Rho. Ils agissent à plusieurs niveaux. Tout d'abord en bloquant l'échange GDP/GTP et l'activité GTPase, d'autre part en solubilisant les GTPases par masquage de la région C-terminale isoprénylée et extraction membranaire de la forme GDP (DerMardirossian and Bokoch 2005). Au niveau structural, les GDIs présentent deux régions N-terminales très flexibles et une région C-terminale qui rend compte de la dualité fonctionnelle des GDIs (Hoffman, Nassar et al. 2000). La région N-terminale est responsable de l'inhibition de la dissociation de GDP et de l'activité GTPase (Hoffman, Nassar et al. 2000; Grizot, Fauré et al. 2001). La région C-terminale forme une poche hydrophobe qui masque l'extrémité isoprényl de la GTPase (Hoffman, Nassar et al. 2000).

L'activité des GDIs peut être régulée par des phosphorylations qui permettent de



stabiliser le complexe GTPase-GDI (Bourmeyster and Vignais 1996) ou le déstabiliser (Gorvel, Chang et al. 1998).

## V . Le complexe Elmo/Dock

Elmo et Dock sont deux protéines conservées qui ont été initialement identifiées comme étant essentielles pour promouvoir la phagocytose chez le ver et les mammifères. Le complexe Elmo/Dock est en fait au cœur de nombreuses voies de signalisation pour l'activation de la GTPase Rac1 ce qui en fait une cible privilégiée pour de nombreux pathogènes. Le mécanisme d'activation de Rac1 par ce complexe n'est pas été encore totalement élucidé. Une description de ces deux partenaires et de leur rôle permettra d'avoir un aperçu du mécanisme de régulation de ce complexe.

### A . Une cible privilégiée de nombreux piratages

Certains pathogènes viennent pirater la voie de signalisation Elmo/Dock à leur profit. Ils peuvent profiter de récepteurs de la voie de signalisation de Rac pour être internalisés comme avec le récepteur BAI1 ; ou bien, comme dans le cas du VIH, perturber le fonctionnement de la voie de signalisation en faisant directement interagir le facteur de virulence Nef avec le complexe Elmo/Dock.

#### ***(a) Le détournement de BAI1***

Nous avons vu précédemment (en page 40) que le récepteur BAI1 permet la reconnaissance et l'internalisation des corps apoptotiques grâce à sa capacité de reconnaissance des phosphatidylsérines et son interaction avec Elmo (Park, Tosello-Trampont et al. 2007). Malheureusement, BAI1 est aussi responsable de la reconnaissance et de l'internalisation de bactéries pathogènes. Das et Collaborateurs ont montré que de nombreuses bactéries Gram négatives comme *Salmonella typhimurium* sont reconnues par BAI1 grâce à leur lipopolysaccharide de surface (Das, Owen et al. 2011). Cette reconnaissance va ainsi déclencher la voie de signalisation de Rac1 et permettre à la bactérie d'être internalisée grâce à une phagocytose non dépendante des opsonines (anticorps qui se lient aux bactéries pour favoriser la phagocytose par les macrophages) et donc affecter la réponse de l'hôte à l'infection (Das, Owen et al. 2011).

#### ***(b) L'invasion des Shigella***

Les *Shigella* sont des entérobactéries pathogènes rencontrées exclusivement chez l'homme. Il semblerait que l'entrée de *Shigella* dans les cellules mette en jeu la voie

Dock/Elmo. En effet, *Shigella* sécrète dans les cellules épithéliales le facteur IpgB1. Ce facteur est capable d'interagir avec Elmo de la même façon que RhoG-GTP et d'induire le remodelage de l'actine et une phagocytose « non-inflammatoire » des bactéries. C'est une première étape dans l'invasion bactérienne des cellules (Handa 2007).

### **(c) L'attaque de Nef**

L'ajout de cellules apoptotiques dans des cultures de cellules infectées par HIV-1 entraîne une inhibition de la transcription virale dépendante de Elmo.

La protéine virale Nef interagit avec de nombreuses protéines de la cellule hôte impliquées dans les voies de signalisation cellulaire dont elle détourne les fonctions à l'avantage du virus (Foster and Garcia 2008). Elle facilite ainsi la propagation du virus vers d'autres cellules de l'hôte et contribue au déficit immunitaire caractéristique de cette maladie. C'est un facteur de virulence très important : en effet, les patients infectés par des souches du VIH Nef-déficiente ne développent pas la maladie ou de façon très lente (Deacon, Tsykin et al. 1995; Kirchhoff, Greenough et al. 1995). Nef est entre autre connue pour affecter la présentation à la surface des cellules d'un grand nombre de récepteurs comme CD4, mais aussi pour altérer la voie de signalisation des récepteurs des cellules T (TCR). En 2004, Janardhan et al. ont mis en évidence l'interaction entre Nef et le complexe Elmo1/Dock2, induisant l'activation de Rac2, et certainement de Rac1 favorisant ainsi l'inhibition de la chimiotaxie des lymphocytes T (Janardhan, Swigut et al. 2004). Ils ont aussi montré qu'un nombre significatif d'acides aminés du domaine SH3 impliqués dans l'interaction avec Nef sont conservés dans les domaines SH3 de Dock1 et Dock2. A l'heure actuelle, la façon dont Nef interagit avec le complexe Elmo1/Dock1 ou 2 n'est pas connue.

## **B . Les protéines de la famille Dock**

Le premier membre et le mieux caractérisé de cette famille est Dock1 (aussi appelé Dock180), il a tout d'abord été identifié comme protéine pouvant lier le domaine SH3 de CrkII grâce à son domaine PxxP C-terminal (Hasegawa, Kiyokawa et al. 1996). Il a ensuite été démontré que Dock interagit avec Rac pour l'activer (Kiyokawa, Hashimoto et al. 1998). Ces données ont été corroborées dans des études génétiques chez *C.elegans* et *Drosophila melanogaster*. Elles ont démontré que Ced-5 et Myoblast city, les orthologues de Dock1 chez ces organismes, sont situés en amont de la GTPase Rac1 et sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la phagocytose, la migration des cellules de bordure, et la

fusion des myoblastes (cellules souches responsables de la formation des muscles squelettiques dans l'embryon).

Des analyses bio-informatiques ont identifié 11 membres de la famille Dock1 chez l'homme (Cote and Vuori 2002). Ces protéines ont été classées en quatre sous-familles en fonction de leur homologie de séquence (Figure 13) (Cote and Vuori 2002; Rossman, Der et al. 2005).

La sous-famille A, comprenant Dock1, Dock2 et Dock5 et la sous-famille B comprenant Dock3 et Dock4 sont des GEFs spécifiques de Rac (Nishihara 1999; Brugnera, Haney et al. 2002; Cote and Vuori 2002; Namekata, Nishimura et al. 2002; Hiramoto, Negishi et al. 2006). Ces deux sous-familles possèdent un domaine SH3 N-terminal nécessaire à la fixation de Elmo.

Les deux sous-familles C et D sont regroupées pour former la famille des zizimines. Dock6, Dock7 et Dock8, appartenant à la sous-famille C, sont moins bien connues. Elles semblent avoir la double spécificité pour Rac1 et Cdc42 (Ruusala and Aspenström 2004; Miyamoto, Yamauchi et al. 2007). Finalement, la sous-famille D avec Dock9, Dock10 et Dock11 sont des GEFs pour Cdc42 (Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2002; Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008).

Toutes ces GEFs partagent deux domaines conservés : les Dock-Homology Region 1 et 2 (DHR1 et DHR2) (Cote and Vuori 2002). Le DHR1 peut lier les phospholipides et permet de localiser les protéines Dock à la membrane. Le DHR2 est le domaine catalytique et est nécessaire et suffisant pour l'activation de Rac (Brugnera, Haney et al. 2002; Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2002; Cote, Motoyama et al. 2005).

Les différentes protéines Dock ne se retrouvent pas dans les mêmes organismes et n'interviennent pas forcément dans les mêmes voies de signalisation. Différentes études ont été menées sur chacune de ces protéines. Etant donné la présence des domaines conservés DHR1 et DHR2 chez tous les membres, la description et la comparaison de ces différents membres de la famille Dock pourra nous permettre d'obtenir de précieuses informations quant au rôle et au mécanisme d'action de la protéine Dock1 sur laquelle nous travaillons.

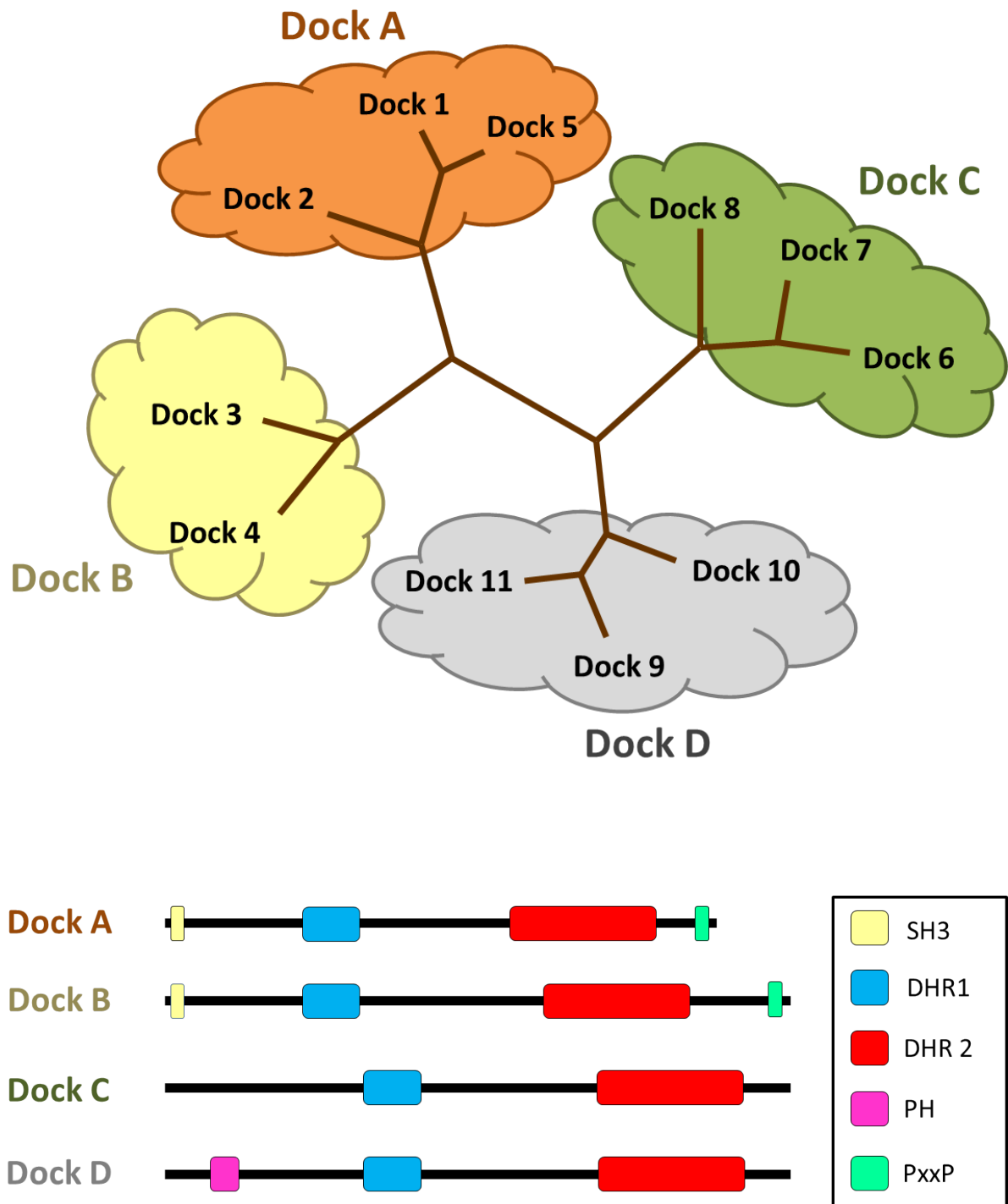


Figure 13 : Les différentes familles des protéines Dock.

La famille des protéines Dock comprend 11 membres chez les mammifères qui peuvent être divisés en 4 sous-familles selon leur homologie de séquence.

## ***1) Sous-famille A***

### ***(a) Dock1***

Dock1 a été identifié pour la première fois chez la *Drosophila* grâce à son orthologue *Myoblast city*, il a tout d'abord été trouvé lors d'un criblage pour des gènes impliqués dans la fusion des myoblastes (Rushton, Drysdale et al. 1995; Erickson, Galletta et al. 1997). La mutation des orthologues de Elmo (dElmo) et de Rac (dRac) chez la drosophile entraînent les mêmes effets que celle de Dock1 ce qui les place donc dans la même voie de signalisation (Erickson, Galletta et al. 1997). *Myoblast city* intervient dans les processus de migration cellulaire durant le développement, notamment la migration des cellules de bordure vers l'ovocyte, la fermeture dorsale par les cellules épithéliales et la fermeture du thorax par les cellules des disques imaginaires de l'aile (Erickson, Galletta et al. 1997; Duchek, Somogyi et al. 2001; Ishimaru, Ueda et al. 2004).

Ced-5, l'orthologue de Dock1 chez *C. elegans*, est impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques avec Ced-2, Ced-12 et Ced-10, les orthologues de CrkII, Elmo et Rac1 respectivement (Hedgecock, Sulston et al. 1983; Ellis, Jacobson et al. 1991). Outre les défauts de phagocytose, la mutation de Ced-5 entraîne aussi des défauts d'élongation chez certains neurones moteurs et des défauts de migration chez les cellules durant le développement cérébral (Gumienny, Brugnera et al. 2001; Wu, Cheng et al. 2002). Néanmoins, les mécanismes moléculaires en aval de Ced5/Ced-12/Ced-10 dans ces processus sont peu connus.

Le rôle de Dock1 chez les mammifères est moins connu que chez les autres organismes décrits précédemment. Dock1 semble presque ubiquitaire, mais n'est pas présent dans les lymphocytes (Nishihara 1999; Fukui, Hashimoto et al. 2001). Lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules en culture avec Elmo, Dock1 induit la formation de lamellipodes, augmente l'étalement et la migration cellulaire (Brugnera, Haney et al. 2002; Grimsley, Kinchen et al. 2004; Cote, Motoyama et al. 2005; Park, Tosello-Tramont et al. 2007; Sanders, Ampasala et al. 2009).

### ***(b) Dock2***

Dock2 est exprimé uniquement dans les cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes et les cellules dendritiques (Nishihara 1999, Fukui, 2001). Dock2 a été impliqué dans de nombreux processus immunitaires tels que : le développement, l'activation, l'adhésion, la polarisation et les processus de migration des lymphocytes (Fukui, Hashimoto

et al. 2001; Sanui, Inayoshi et al. 2003; Kunisaki, Nishikimi et al. 2006). De même, la translocation du TCR aux synapses immunologiques semble dépendante de Dock2 (Sanui, Inayoshi et al. 2003).

### **(c) Dock5**

La protéine Dock5 est la moins bien connue de la sous-famille A. Sa forte similarité avec Dock1 suggère toutefois qu'elle est elle aussi une GEF pour Rac (Omi, Kiyokawa et al. 2008). La déplétion de Dock5 ou de Dock1 inhibe l'étalement et la migration cellulaire (Sanders, Ampasala et al. 2009). Plusieurs données expérimentales tendent à démontrer que Dock5 et Dock1 ont des fonctions redondantes (Laurin, Fradet et al. 2008).

## **2) Sous-famille B**

### **(a) Dock3**

La protéine Dock3 est exprimée de façon prédominante dans les neurones et se localise dans les cônes de croissance et les « ruffles » membranaires. Elle semble être impliquée dans la croissance des neurites. Dans les cellules en culture, Dock3 active Rac, augmente l'étalement et la migration cellulaire (Namekata, Enokido et al. 2004; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008).

### **(b) Dock4**

Dock4 est fortement exprimée dans le cerveau, et joue un rôle dans la croissance dendritique et la migration cellulaire. De plus, il semble être une GEF pour les GTPases Rap1 et Rac1 (Yajnik, Paulding et al. 2003; Hiramoto, Negishi et al. 2006; Ueda, Fujimoto et al. 2008).

## **3) Sous-famille C**

### **(a) Dock6**

Dock6 est une GEF pour Rac1 et Cdc42 spécifique des cellules neuronales (Miyamoto, Yamauchi 2007).

### **(b) Dock7**

Dock7 est fortement exprimée dans le cerveau en développement, elle active Rac1 et régule la croissance axonale et la migration cellulaire (Watabe-Uchida, John et al. 2006; Yamauchi, Miyamoto et al. 2008; Blasius, Brandl et al. 2009).

**(c) Dock8**

La protéine Dock8, exprimée chez les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T, est un activateur de Cdc42. Dock8 est impliquée dans la signalisation chez le lymphocyte B et la production d'anticorps (Su, Jing et al. 2011; Jabara, McDonald et al. 2012), la survie des lymphocytes T (Randall, Chan et al. 2011). Elle est aussi essentielle pour la migration des cellules dendritiques (Harada, Tanaka et al. 2012).

**4) Sous-famille D****(a) Dock9**

Dock9 est le membre le mieux caractérisé de la sous-famille D. On l'appelle aussi zizimine1. Elle est fortement exprimée dans le cerveau lors du développement, où elle joue un rôle dans la croissance des neurites (Meller, Westbrook et al. 2008). Dock9 est spécifique de Cdc42 et peut dimériser via son domaine catalytique (Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2004).

**(b) Dock10**

Dock10 est une GEF pour Cdc42 et semble impliquée dans la transition entre différents types de migration grâce à l'activation de ces effecteurs N-WASP et PAK (Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008; Kuramoto, Negishi et al. 2009). L'expression de Dock10 induite par l'interleukine 4 dans les lymphocytes B suggère aussi un rôle pour cette protéine dans la réponse immunitaire (Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008).

**(c) Dock11**

Dock11 exprimée dans les lymphocytes semble spécifique de Cdc42 (Nishikimi, Meller et al. 2005). Un mécanisme de rétroaction positive a été mis en évidence, il permettrait d'augmenter l'activité GEF de Dock11 et de protéger la GTPase activée des GAP (Lin, Yang et al. 2006).

**5) Les domaines fonctionnels**

Les protéines Dock sont de grandes protéines multidomaines (Figure 13) de plus de 180 kDa. La fonction et les mécanismes de régulation de ces différents domaines sont depuis quelques années très étudiés.

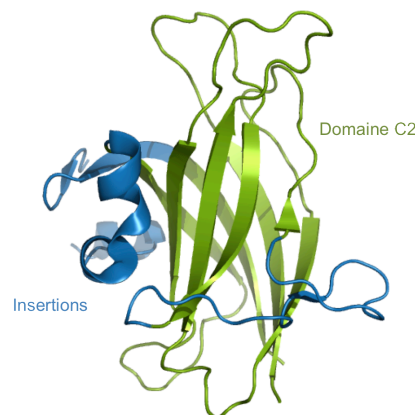
**(a) Le domaine DHR1**

Les domaines DHR1, d'environ 200 acides aminés, sont connus pour se lier aux



phospholipides et ainsi permettre le recrutement à la membrane de la protéine. Chez les protéines Dock, il est toujours présent en amont du domaine DHR2.

La structure du domaine DHR1 de Dock1 (Figure 14) a été déterminée par cristallographie aux rayons X (code pdb 3L4C) (Premkumar, Bobkov et al. 2010). Son repliement en sandwich  $\beta$  similaire à celui des domaines C2 lui permet de lier les phosphoinositides (Cote and Vuori 2002; Cote, Motoyama et al. 2005). En effet, Dock1 utilise son domaine C2 et des boucles de surface pour créer une poche basique dans sa surface de reconnaissance des phosphoinositides. Toutefois ce site de fixation est différent du site classiquement observé dans les domaines C2 grâce à deux insertions (Figure 14). Cette poche possède plusieurs caractéristiques communes avec les domaines PH (Pleckstrin homology). Cette interaction avec un constituant de la membrane permet le recrutement de Dock1 au niveau du front de migration des cellules en mouvement (Cote, Motoyama et al. 2005).



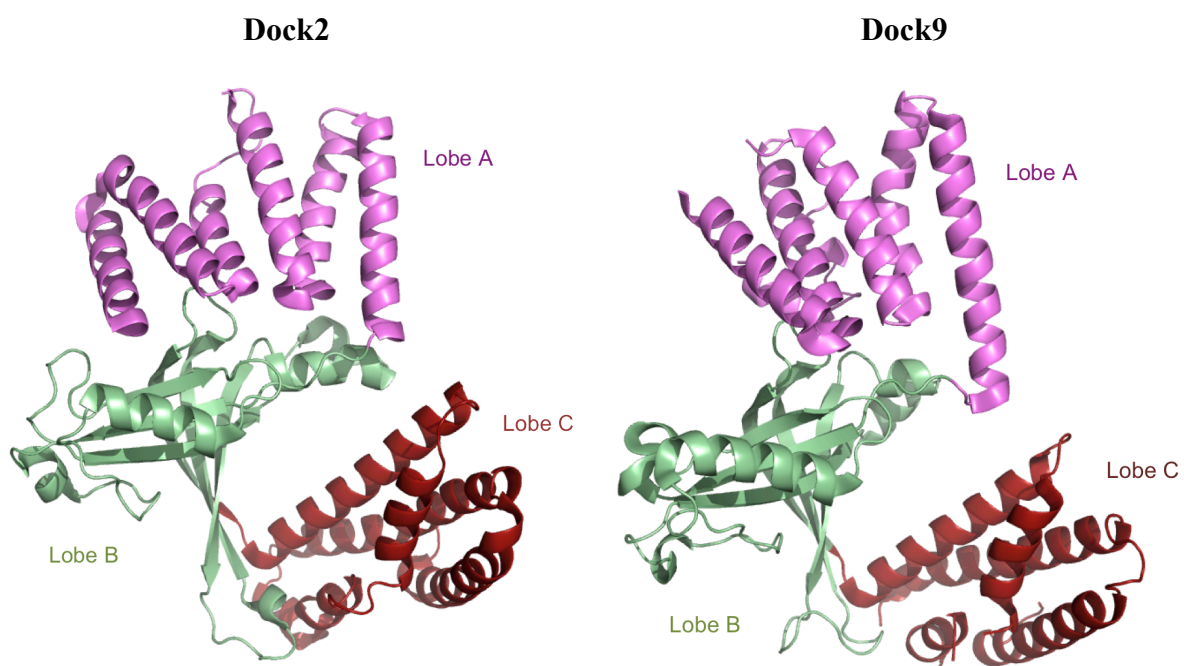
**Figure 14 : Structure cristalline du domaine DHR1 de Dock 1. Code PDB 3L4C (Premkumar, Bobkov et al. 2010).**

### ***(b) Le domaine DHR2***

Le domaine DHR2 porte la fonction GEF pour les GTPases Rho. Ce domaine d'environ 450 acides aminés est bien plus large que le domaine DH des GEF classiques mais interagît lui aussi avec la forme vide de la GTPase pour lequel il est spécifique (Brugnera, Haney et al. 2002; Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2004; Nishikimi, Meller et al. 2005; Hiramoto, Negishi et al. 2006; Lin, Yang et al. 2006; Miyamoto, Yamauchi et al. 2007). Ainsi, les domaines DHR2 des familles A et B sont spécifiques de Rac1. Les membres de la famille D ainsi que Dock8 sont spécifiques de Cdc42, et une double spécificité pour Rac1 et Cdc42 est montrée pour Dock6.

Des études fonctionnelles ont montré que le domaine DHR2 de Dock1 est nécessaire et suffisant à l'activation de Rac1 à la fois *in vitro* et *in cellulo* (Kiyokawa, Hashimoto et al. 1998; Cote and Vuori 2002; Cote and Vuori 2006). Cependant d'autres études cellulaires montrent que l'activation de Rac1 ne peut se faire qu'avec la surexpression concomitante de Dock1 et Elmo, suggérant ainsi que Dock1 n'est pas fonctionnelle seule (Brugnera, Haney et al. 2002; Grimsley, Kinchen et al. 2004; Lu, Kinchen et al. 2004). Cette apparente contradiction sera discutée par la suite.

La structure des domaines DHR2 de Dock2 et de Dock9 en présence ou non de leur GTPase spécifique respective Rac1 et Cdc42, a été déterminée par cristallographie (code pdb 2YIN et 2WMO). Ces domaines DHR2 diffèrent des domaines DH des autres GEFs, ils sont organisés en trois lobes de même taille (Figure 15). Ces structures ont permis d'identifier les résidus impliqués dans la spécificité pour Rac1 ou Cdc42, le site de fixation de la GTPase est porté par deux des trois lobes. Le mécanisme d'échange du GTP diffère aussi légèrement par rapport aux mécanismes retrouvés dans les domaines DH des autres GEFs (Yang, Zhang et al. 2009; Kulkarni, Yang et al. 2011).



**Figure 15 : Structures cristallines du domaine DHR2.**  
Dock2 (à gauche) code PDB 2YIN, et Dock9 (à droite) code PDB 2WMO (Yang, Zhang et al. 2009; Kulkarni, Yang et al. 2011)

### (c) Le domaine SH3

Les domaines SH3 (Src Homology 3) sont des petits domaines d'environ 60 acides aminés rencontrés dans de nombreuses protéines impliquées dans des voies de signalisation, ils sont connus pour interagir avec des motifs polyproline (PxxP). Ce domaine est retrouvé à l'extrémité N-terminale des membres des sous-familles Dock A et B.

Des études fonctionnelles montrent *in vitro* sa spécificité d'interaction avec le motif PxxP de Elmo (en page 70), et *in vivo* son rôle dans les voies de la phagocytose et de la motilité cellulaire (Zhou, Caron et al. 2001; Komander, Patel et al. 2008). Cependant, le domaine SH3 n'est pas indispensable à l'interaction de Elmo avec Dock, des hélices  $\alpha$  avoisinantes aussi bien chez Elmo que chez Dock sont aussi impliquées dans cette interaction (Figure 20) (Komander, Patel et al. 2008). Les mécanismes d'interaction seront présentés dans un paragraphe suivant.

De façon surprenante, il semblerait que ce domaine SH3 soit capable d'interagir directement avec le domaine DHR2, de telle sorte à suggérer un mécanisme d'autoinhibition des protéines Dock des familles A et B (Lu, Kinchen et al. 2005).

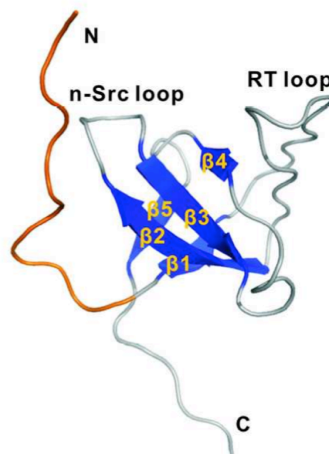


Figure 16: Structure RMN du domaine SH3 de Dock1.  
Code PDB 2MOY (Liu, Li et al. 2012).

### (d) Les motifs Polyproline

Des régions riches en proline appelées polyproline (PxxP) sont retrouvées dans la séquence des Dock 1 à 5, généralement localisés à l'extrémité C-terminale de la protéine. Chez Dock1, ce motif permet une interaction avec le domaine SH3 (Sanui, Inayoshi et al. 2003) de la protéine adaptatrice CrkII qui permettrait son recrutement à la membrane (Matsuda, Ota et al. 1996).

## C . Les protéines de la famille Elmo

Les protéines de la famille Elmo ont été initialement identifiées chez *C.elegans*, avec l'orthologue Ced-12, lors d'un criblage pour découvrir les gènes contrôlant la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques (Chung, Gumienny et al. 2000). Plus tard, il a été montré que Ced-12 était impliqué dans la même cascade génétique de la phagocytose des corps apoptotiques que Ced-2, Ced-5 et Ced-10 (Wu, Tsai et al. 2001). La protéine Ced-12 est très conservée et elle est représentée par trois membres chez les mammifères : Elmo1, Elmo2 et Elmo3 (Engulfment and Cell Motility) où elle est exprimée dans différents types de tissus (Gumienny, Brugnera et al. 2001; Katoh, Hiramoto et al. 2006). Les protéines Elmo1 et Elmo2 présentent une identité de séquence supérieure à 75 %, et peuvent être facilement interchangeables (Sanui, Inayoshi et al. 2003; Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012). Les protéines Elmo d'environ 700 résidus sont constituées de plusieurs domaines protéiques (Figure 17).

Des études chez les cellules de mammifères suggèrent que Dock1 et Elmo interagissent ensemble et coopèrent pour activer Rac1 dans le but d'optimiser la phagocytose des corps apoptotiques et la migration cellulaire (Grimsley, Kinchen et al. 2004).

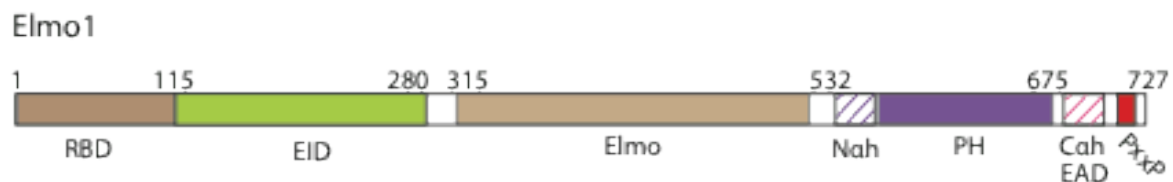


Figure 17 : Représentation schématique des différents domaines de Elmo1.

### 1) Les différents domaines

#### (a) Le domaine RBD

L'extrémité N-terminale de Elmo1 contient un domaine nommé RBD (RhoG binding Domain ; résidus 1 à 115) qui interagit avec la GTPase RhoG chargée en GTP, les protéines ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) et le récepteur membranaire BAI1 (Figure 21) (Katoh and Negishi 2003; deBakker, Haney et al. 2004; Grimsley, Lu et al. 2006; Elliott, Zheng et al. 2010). Cette région d'interaction ne présente aucune homologie avec des séquences protéiques connues. Elle pourrait jouer un rôle important dans la localisation de la protéine grâce à son interaction avec des partenaires localisés à la membrane.

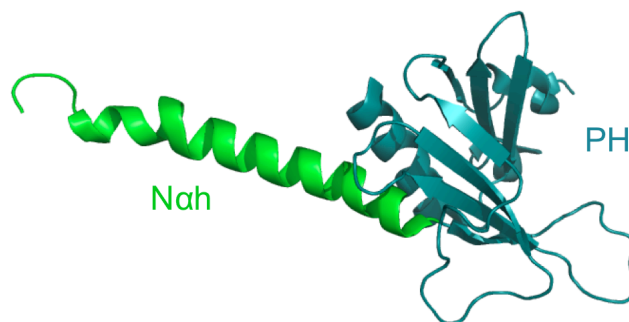
### **(b) Le domaine ELM**

Un domaine Elmo (ou ELM) très conservé, spécifique aux protéines de la famille Elmo est retrouvé dans la région centrale. Aucune fonction n'est décrite pour ce domaine, cependant des domaines homologues ont été découverts au sein des protéines ElmoD1 et ElmoD2, activatrices des GTPases Arf de la famille Ras (Bowzard, Cheng et al. 2007; Johnson, Longo-Guess et al. 2012). Cette fonction chez Elmo1, 2 ou 3 n'a pas été démontrée.

### **(c) Le domaine PH**

Les protéines de la famille Elmo sont caractérisées par un domaine PH dans la région C-terminale. Les domaines PH sont généralement impliqués dans la signalisation intracellulaire. Ils possèdent la capacité de se lier aux phospholipides qui leur permet de jouer un rôle de recrutement à la membrane (Lemmon 2008).

Toutefois, la structure du domaine PH de Elmo1 déterminée par cristallographie en 2008, montre qu'il ne possède pas motifs structuraux de fixation des phospholipides (Figure 18). Des études complémentaires confirment que ce domaine est incapable de se lier aux différents lipides (Komander, Patel et al. 2008).



**Figure 18 : Structure cristalline du domaine PH de Elmo1.**  
Code PDB 2VSZ (Komander, Patel et al. 2008).

### **(d) Le motif PxxP**

Une séquence riche en prolines à l'extrémité C-terminale des protéines Elmo est retrouvée. Ce motif PxxP interagit avec le domaine SH3 de Dock (en page 65). Son rôle dans l'interaction et l'activité de Dock sera étudié tout au long de cette thèse.

- IPDAPPPI**P**KE**P**SN -

**Figure 19 : Séquence du motif PxxP de Elmo1.**  
Résidus 706 à 719, le motif PxxP canonique d'interaction pour les domaines SH3 correspond aux résidus P<sub>714</sub>-P<sub>717</sub> en rouge (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012).

### ***(e) Les domaines EID et EAD***

Une analyse récente de la séquence de Elmo par bioinformatique a mis en évidence des nouveaux domaines chez Elmo qui présentent une homologie avec domaines retrouvés dans les formines relatives à Dia1. Ces protéines ont un rôle central dans la nucléation de l'actine (Figure 5) (Zigmond 2004). Elles possèdent deux domaines d'auto-inhibition bien caractérisés, le DID (Diaphanous Inhibitory Domain) avec un repliement Armadillo et le DAD (Diaphanous Auto-regulatory Domain). Elmo possède deux domaines similaires appelés EID pour « Elmo Inhibitory Domain » dans la région N-terminale, et EAD pour « Elmo Auto-regulatory Domain » qui correspond à l'hélice  $\alpha$  C $\alpha$ h, dans la région C-terminale (Patel, Margaron et al. 2010).

La présence d'une auto-inhibition comparable à Dia1 a été étudiée et sera présentée en page 69.

## ***2) Localisation cellulaire***

Par le biais d'interactions avec ses différents partenaires, Elmo peut être recruté à la membrane et localisé à proximité du cytosquelette d'actine à remodeler.

### ***(a) Interaction avec RhoG***

La GTPase RhoG semble impliquée dans l'activation et le recrutement de Elmo à la membrane. Une interaction entre les protéines de la famille Elmo (Elmo1 et Elmo2) et RhoG a été démontrée (Katoh and Negishi 2003; Grimsley, Lu et al. 2006; Katoh, Hiramoto et al. 2006; Ho, Irvine et al. 2009). Cette interaction est possible seulement si la GTPase RhoG est sous sa forme activée, chargée en GTP (Katoh and Negishi 2003; Grimsley, Lu et al. 2006; Ho, Irvine et al. 2009).

Un mutant de RhoG incapable de se lier à Elmo perturbe la migration et l'élongation cellulaire (Katoh and Negishi 2003). Cependant, une délétion de RhoG chez la souris ne montre pas de phénotype particulier (Vigorito, Bell et al. 2004).

### ***(b) Interaction avec BAI1***

Le recrutement de Elmo à la membrane peut aussi se faire par une interaction directe avec les récepteurs des signaux « mangez-moi » à la surface du phagocyte. Le récepteur BAI1 (Brain specific Angiogenesis Inhibitor 1) reconnaît la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules en apoptose. C'est un récepteur transmembranaire de plus de 1500 résidus, appartenant à la famille des GPCR (Récepteurs couplés aux protéines G). Son extension

cytoplasmique interagit avec la région N-terminale de Elmo (résidus 1-558) pour permettre d'induire l'ingestion des cellules apoptotiques (Figure 21) (Park, Tosello-Tramont et al. 2007).

### ***(c) Interaction avec les ERM***

Les protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) sont associées à la mobilité cellulaire, la formation des microvillosités, des ondulations de la membrane et des sites d'adhésion. Ces fonctions sont permises par leur capacité à lier le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Bretscher, Edwards 2002, Mangeat, Roy 1999, Tsukita, Yonemura 1999).

Des études *in vitro* montrent que les protéines ERM s'associent directement avec Elmo1 (Figure 21). La liaison ERM/Elmo1 est portée par la portion N-terminale de Elmo1, qui peut lier à la fois la Radixine, une protéine ERM, et la GEF Dock1 sans altérer l'activation de Rac en aval du complexe Elmo1/Dock1. De plus, la liaison Radixine/Elmo1 n'empêche pas l'interaction RhoG/Elmo1. Bien que leurs sites d'interaction sur Elmo1 se superposent, un complexe RhoG/Elmo1/Radixine peut être détecté. Ces trois protéines se colocalisent à la membrane plasmique (Grimsley, Lu et al. 2006).

## **3) Régulation**

### ***(a) Auto-régulation de Elmo***

A partir de la détermination des nouveaux domaines d'autorégulation EID et EAD par homologie avec la forme Dia1, la présence d'un mécanisme similaire d'autorégulation chez Elmo1 a été étudiée. Dia1 est un effecteur de la GTPase RhoA, son interaction vient activer Dia1 en rompant l'interaction intramoléculaire entre les deux domaines DID et DAD (Chesarone, DuPage et al. 2010).

Ainsi, une étude montre que le domaine EID peut interagir avec le domaine EAD (Figure 21). De plus, des expériences ont montré que des mutation empêchant la formation de cette interaction permet d'améliorer la signalisation dépendant de Rac1 en aval (Patel, Margaron et al. 2010).

L'association avec RhoG permet d'empêcher cette interaction, il semblerait donc qu'il y ait une compétition *in vitro* entre RhoG et le domaine EAD pour fixer le EID, suggérant ainsi un possible mécanisme de levée de l'auto-inhibition de Elmo par RhoG sous sa forme active.



### ***(b) Hck et la phosphorylation des protéines Elmo***

La phosphorylation des protéines de la famille Elmo a été relativement peu étudiée. Miller et col. ont démontré que la tyrosine kinase Hck, membre de la famille Src, impliquée dans différents processus cellulaires liés au cytosquelette, et spécifique des cellules hématopoïétiques, peut induire la phosphorylation de Elmo1. Les deux protéines Elmo1 et Hck forment un complexe qui met en jeu une interaction avec le domaine SH3 de Hck (Figure 21) (Scott, Zappacosta et al. 2002).

La mutation des tyrosines de Elmo1 impliquées dans la phosphorylation n'altère pas l'interaction avec Dock1 et CrkII. Cependant, des essais fonctionnels de migration et de phagocytose semblent suggérer une importance de cette phosphorylation dans l'activité des protéines de la famille Elmo (Yokoyama, deBakker et al. 2005).

## **D . Le complexe Elmo/Dock**

### ***1) Un mécanisme contradictoire ?***

Les premières études *in cellulo* suggèrent que Dock1 n'est pas une GEF fonctionnelle d'elle-même, l'activation de Rac1 n'est observée que lors de sa co-expression avec Elmo (Gumienny, Brugnera et al. 2001; Brugnera, Haney et al. 2002; Lu, Kinchen et al. 2004). Le domaine PH de Elmo a d'abord été décrit comme un domaine structural qui ne lie pas Dock1 mais coopère avec son domaine DHR2 pour faciliter l'interaction de Rac1 et donc promouvoir l'activité GEF. Une étude a aussi suggéré que la surexpression de Elmo1 dans une lignée cellulaire de plasmocytome (tumeur maligne développée à partir de plasmocytes) améliore le chargement en GTP de Rac1 appuyant l'idée qu'Elmo peut promouvoir l'activité GEF de Dock1 pour Rac1 (Gotoh, Tanaka et al. 2008).

En revanche, plusieurs autres études *in vitro* ont démontré que l'expression de Dock1 ou de son domaine DHR2 seul, est suffisante pour entraîner l'échange de GDP/GTP sur Rac1 (Kiyokawa, Hashimoto et al. 1998; Cote and Vuori 2002; Cote and Vuori 2006). De plus, les autres membres de la famille Dock ne nécessitent pas l'interaction à Elmo pour leur activité (Cote and Vuori 2002; Meller, Irani-Tehrani et al. 2002; Namekata, Enokido et al. 2004; Watabe-Uchida, John et al. 2006). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces divergences. D'une part, la co-expression de Elmo avec Dock1 facilite grandement l'accumulation des protéines Dock1 dans les cellules en prévenant leur dégradation par le système ubiquitine protéasome (Brugnera, Haney et al. 2002), (Makino, Tsuda et al. 2006). Ceci peut expliquer en partie



pourquoi une plus forte activité de Rac1 peut être observée lorsque Elmo et Dock1 sont co-exprimées (Brugnera, Haney et al. 2002). Une autre explication pourrait être que Elmo facilite la co-localisation de Dock1 et Rac1 à la membrane et ainsi entraîne indirectement l'activité GEF pour Rac1. La région N-terminale des protéines Elmo a en effet été décrite comme ayant une capacité de ciblage à la membrane par l'intermédiaire de RhoG (Grimsley, Kinchen et al. 2004).

Il n'a pas été évident à partir de ces différentes observations de déterminer si l'activité GEF de Dock envers Rac1 est Elmo-dépendante (modèle de GEF bipartite) ou si Elmo joue un rôle additionnel essentiel durant la voie de signalisation de Rac1 en aval du complexe Elmo/Dock1. Pour répondre à cette question, le mécanisme d'interaction entre Elmo1 et Dock1 a été étudié plus en détail.

Des expériences de co-précipitation ont tout d'abord suggéré que le domaine SH3 de Dock pouvait interagir avec le motif PxxP de Elmo (Gumienny, Brugnera et al. 2001). Puis, différents essais fonctionnels ont démontré l'implication du motif PxxP et du domaine SH3 de Dock dans la phagocytose (Zhou, Caron et al. 2001) et la migration cellulaire (Lu, Kinchen et al. 2005), (Komander, Patel et al. 2008). L'implication de l'hélice  $\alpha$  de Elmo Cah (résidus 680-699) a aussi été suggérée par une étude extensive de mutations (L689A, M691S, E692D, R696K, L697A et L698A) résultant en une perte complète de la migration cellulaire (Grimsley, Kinchen et al. 2004).

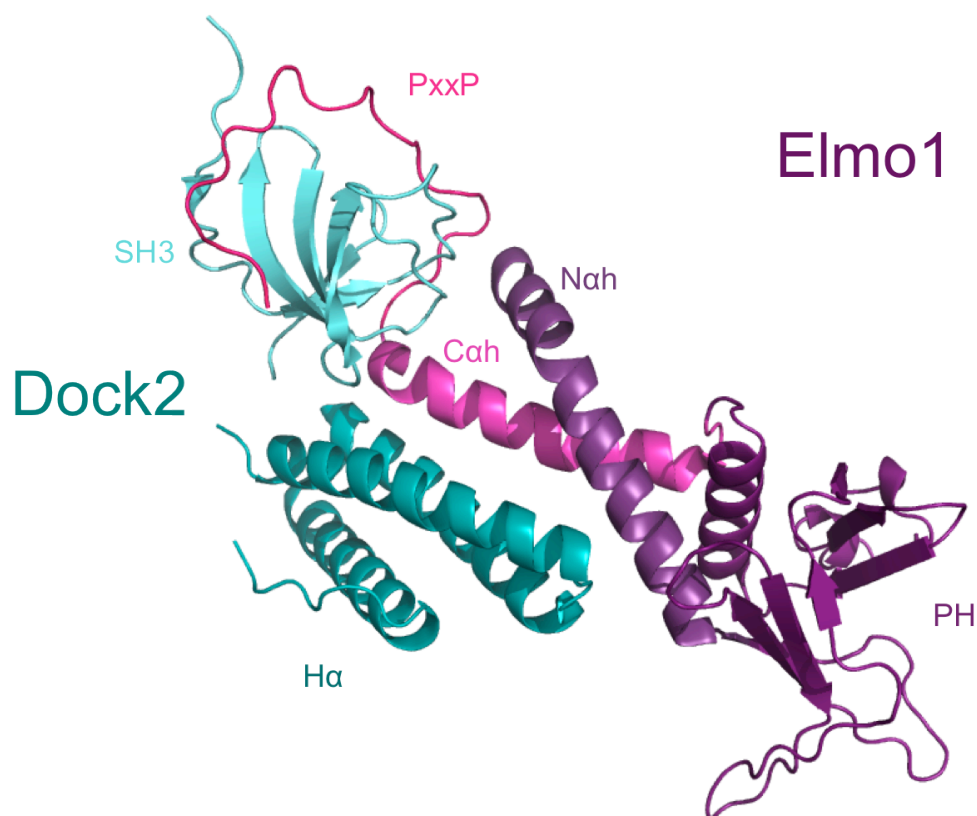
De façon surprenante, ils ont aussi montré qu'une construction de Dock1 sans le domaine SH3 était tout de même capable d'interagir avec Elmo et de promouvoir la migration cellulaire. L'équipe de Coté a ensuite montré par des expériences de co-précipitation que le motif PxxP de Elmo et le domaine SH3 de Dock1 n'étaient pas indispensables à l'interaction Elmo/Dock (Komander, Patel et al. 2008). Ils ont identifié sur Elmo un domaine minimal de liaison à Dock qui inclut le domaine PH et les hélices  $\alpha$  adjacentes (résidus 532-707). Les résidus hydrophobes dans l'hélice  $\alpha$  Nah apparaissent critiques dans l'interaction avec Dock1. Cette région montre une forte affinité pour les résidus 1 à 177 de Dock1 avec un rôle prépondérant pour les résidus hydrophobes positionnés dans une région en hélice  $\alpha$  prédite dans Dock1 adjacente au domaine SH3 (résidus 69-177).

Le domaine C-terminal de Elmo qui interagit directement avec Dock1 a aussi montré son importance dans l'activation de Rac1 en agissant « en trans » de Dock1 (Lu, Kinchen et al. 2004). Finalement, les études montrent que Elmo n'est pas requis pour l'activation de Rac, cependant, la formation du complexe Elmo/Dock1 est essentielle à la polarisation cellulaire et

la migration induite par Rac1.

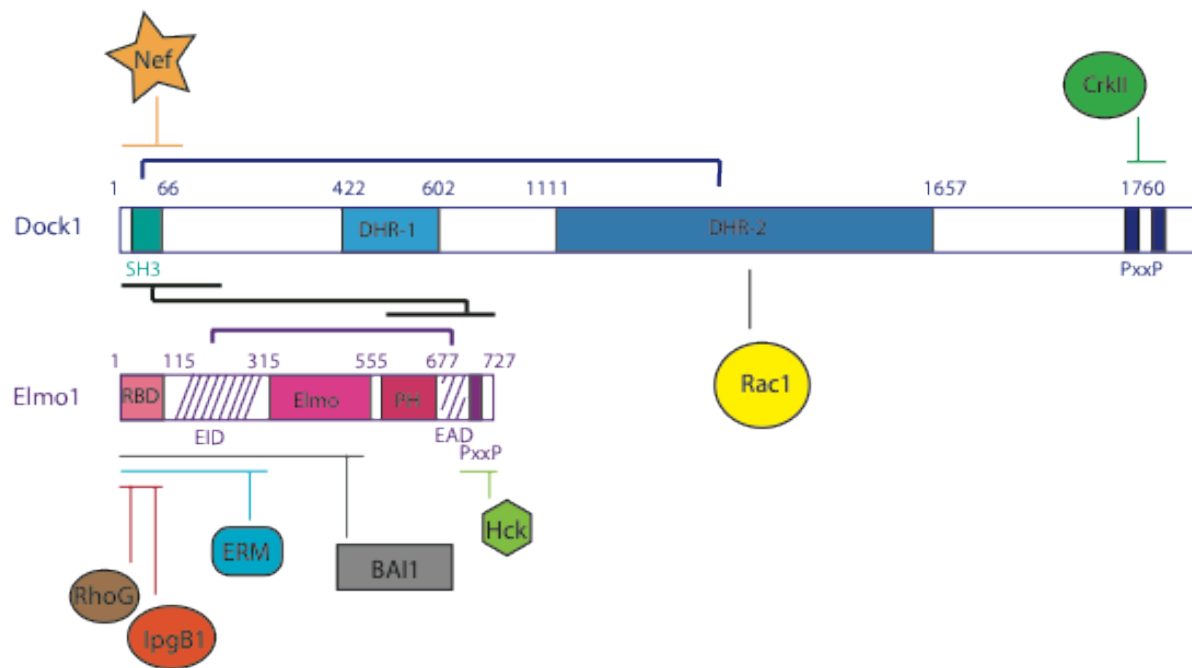
## ***2) Bases structurales de l'interaction***

Très récemment, la structure de la région C-terminale de Elmo1 incluant le domaine PH et le motif PxxP en complexe avec les 167 premiers résidus de Dock2 a été déterminée (code pdb 3A98 ; Figure 20) (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012). Cette structure confirme à un niveau structural, l'implication des deux hélices  $\alpha$  entourant le domaine PH et le « bundle » d'hélices  $\alpha$  de Dock adjacent au domaine SH3 (résidus 69-167), dans l'interface d'interaction suggérée plus tôt (Komander, Patel et al. 2008). Cependant, ces données structurales montrent aussi une grande interface d'interaction du domaine SH3 avec le motif PxxP de Elmo1, qui va dans le sens des données fonctionnelles pour lesquelles la présence à la fois du motif PxxP de Elmo1 et du domaine SH3 de Dock contribue à promouvoir le remodelage du cytosquelette d'actine.



**Figure 20 : Structure cristalline du complexe entre le fragment Elmo $\Delta$ N de Elmo1 et le fragment SH3-H $\alpha$  de Dock2.**

**Code PDB 3A98 (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012).**



**Figure 21 : Le complexe Elmo1/Dock1 et ses différents partenaires.**

## VI . Objectifs du travail de thèse

Les protéines eucaryotes Elmo (Engulfment and Cell Motility) forment une famille de régulateurs conservés qui jouent un rôle central dans les processus biologiques reposant sur le remodelage du cytosquelette d'actine comme la phagocytose et la migration cellulaire. Les protéines Elmo régulent la fonction des protéines Dock (Downstream of Crk), une nouvelle famille de Facteurs d'Echange de Guanine (GEF) pour les GTPases Rac1 et Cdc42. Le mécanisme de régulation repose sur l'interaction entre les 200 résidus C-terminaux d'Elmo et les 180 premiers résidus N-terminaux de Dock. Cependant, le rôle précis des différents domaines et motifs identifiés dans ces régions n'est pas encore défini. En effet, les données fonctionnelles, biochimiques et structurales rapportées à ce jour semblent contradictoires quant à la contribution de l'extrémité C-terminale de Elmo qui comprend un motif polyproline et le domaine SH3 N-terminal de Dock.

Le projet Elmo/Dock a été initié au laboratoire en 2006. Ce projet de recherche s'intègre dans le projet global du groupe « Réponse immunitaire aux pathogènes et soi altéré » à l'IBS sur les voies de signalisation impliquées dans la reconnaissance et l'élimination des cellules en mort programmée. Le projet Elmo/Dock implique deux équipes qui apportent chacune leur expertise spécifique en immunologie, biologie moléculaire, biologie cellulaire, biochimie et biologie structurale. L'équipe de Philippe Frachet et Jean-Philippe Kleman utilise une approche cellulaire pour mener une étude fonctionnelle. Tandis que l'équipe de Dominique Housset et Jean-Baptiste Reiser, dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, s'intéresse plus à des aspects biochimiques et structuraux pour caractériser les mécanismes moléculaires d'activation de l'activité GEF de Dock pour la GTPase Rac1 par Elmo. C'est dans ce cadre-là que s'est inscrit mon projet de thèse.

Deux principaux objectifs ont été définis :

- Caractériser les différentes interactions entre les protéines Elmo et Dock pour comprendre comment celles-ci permettent de réguler la fonction GEF du complexe qui en retour permet d'activer Rac1.
- Obtenir des données structurales sur la protéine Elmo1.

L'interaction entre la protéine Elmo1 avec Dock1 semble portée par les régions C-terminale de Elmo1 et N-terminale de Dock1. Les données bibliographiques n'apportent pas d'information pour quantifier l'importance de chaque région mise en jeu lors de l'interaction. Nous avons ainsi décidé d'étudier cette interaction par résonance plasmonique de surface. Cette technique permet de quantifier de façon précise l'affinité de deux protéines.

En parallèle des études d'interaction, une approche structurale par cristallographie aux rayons X et SAXS a été mise en place sur la protéine Elmo1 et le complexe Elmo1/Dock1. Nous avons entrepris une démarche d'étude par domaine pour favoriser la chance d'obtenir des données structurales.



# Matériels et Méthodes

---





Afin d'étudier la structure et l'interaction des protéines Elmo et Dock, plusieurs techniques complémentaires, ont été utilisées. Ces expériences nécessitent auparavant d'obtenir des échantillons protéiques en grande quantité et d'une grande qualité de pureté et d'homogénéité).

Les méthodes de biologie moléculaire permettent la production de l'ADN recombinant codant pour ces protéines qui permettra par la suite de surexprimer la protéine d'intérêt dans des bactéries pour enfin les extraire et les purifier. Afin de caractériser ces échantillons protéiques, des techniques de biochimie et de biophysique ont été mises en place.

Je décris ici les différentes techniques employées pour la production et l'étude de ces protéines.

## I . Biologie Moléculaire

Le gène codant pour la protéine Elmo1 sauvage de souris nous a été fourni par le Dr Yoshinori Fukui. Les constructions de Elmo1 ainsi que celles de fragments de Elmo1 ont été produites par clonage au laboratoire dans le vecteur pPROEX-Htb. Le gène codant pour le domaine SH3 de la protéine Dock1 sauvage humaine a été synthétisé et cloné par la société Geneart AG dans le vecteur pET-28a. La construction de pGex-TEV-SH3<sub>1</sub> a été produite à partir d'un clone de Dock1 par Julien Pérard au laboratoire. Les gènes codant pour le domaine Dock1-177 des protéines Dock1 et Dock2 sauvages humaines ont aussi été synthétisés par la société Geneart AG puis clonés dans le vecteur d'expression pET28a. Toutes les protéines sont ainsi clonées dans des vecteurs d'expression bactérienne qui permettront leur production en grande quantité afin de mener toutes les études nécessaires à leur caractérisation.

	Nom	Fragment (séquence protéique)	Vecteur (expression bactérienne)	Résistance	Étiquette	Site de coupure	Masse Molaire (kDa)	Nombre d'aa	pI	E <sub>(0,1%)</sub>
<b>Elmo1</b>	ElmoWT	1-727	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	87,36	756	5,9	0,775
	ElmoΔPxxP	1-707	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	85,1	736	6,06	0,76
	ElmoΔC	1-675	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	81,4	704	6,29	0,795
	ElmoN	1-532	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	64,7	560	6,07	0,734
	Elmo1-350	1-350	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	43,29	379	5,87	0,795
	Elmo1-146	1-146	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	19,92	175	5,81	1,15
	ElmoΔN	532-727	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	26,2	226	5,64	0,995
	ElmoΔNΔPxxP	532-707	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	24	206	5,98	0,962
	ElmoPH	532-675	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	20,2	174	6,56	1,14
	Elmo350-727	350-727	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	47,74	408	5,95	0,82
	Elmo350-675	350-675	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	41,73	356	6,63	0,87
	Elmo350-532	350-532	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	25,05	212	6,3	0,76
	Elmo146-727	146-727	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	71,13	612	5,96	0,722
	Elmo146-675	146-675	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	65,13	560	6,44	0,732
	Elmo146-532	146-532	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	48,45	416	6,19	0,63
	Elmo146-350	146-350	pPROEX-HTb	Amp	6His	TEV	38,53	333	6	0,61
	ElmoWT-BirA	1-727	pPROEX-HTb	Amp	6His BirA	TEV -	89,5	774	5,8	0,817
	ElmoΔC-BirA	1-675	pPROEX-HTb	Amp	6His BirA	TEV -	83,4	721	6,14	0,842
	ElmoPH-BirA	532-675	pPROEX-HTb	Amp	6His BirA	TEV -	22,2	191	6,17	1,283
	ElmoΔN-BirA	532-727	pPROEX-HTb	Amp	6His BirA	TEV -	28,3	243	5,43	1,18
<b>Dock1</b>	SH3 <sub>1</sub>	9-72	pET-28a	Kan	-	-	7,6	66	8	2,2
	SH3 <sub>1</sub> -BirA	9-72	pET-28a	Kan	6His BirA	TEV -	9,4	81	5,9	2,27
	SH3 <sub>1</sub> -Hα	1-177	pET-28a	Kan	-	-	23,3	200	6,6	1,823
	SH3 <sub>1</sub> -Hα-BirA	1-177	pET-28a	Kan	6His BirA	TEV -	26,1	226	6,06	1,889
	GST-SH3 <sub>1</sub>	9-72	pGEX-TEV	Amp	GST	Thromb ine	34,8	299	6,27	1,73
<b>Dock 2</b>	SH3 <sub>2</sub> -Hα	1-177	pET-28a	Kan	-	-	23,1	200	7,89	1,82
	SH3 <sub>2</sub> -Hα-BirA	1-177	pET-28a	Kan	6His BirA	TEV -	27	226	6,42	1,88

**Tableau II : Récapitulatif des constructions réalisées durant ma thèse.**

Dans le but de caractériser les protéines Elmo et Dock, une stratégie de production de fragments a été mise en place. Kan : Kanamycine, Amp : Ampicilline, 6His : étiquette hexahistidine, BirA : étiquette de biotinylation, GST : Glutathion-S-transférase, TEV : Tobacco Etch Virus.

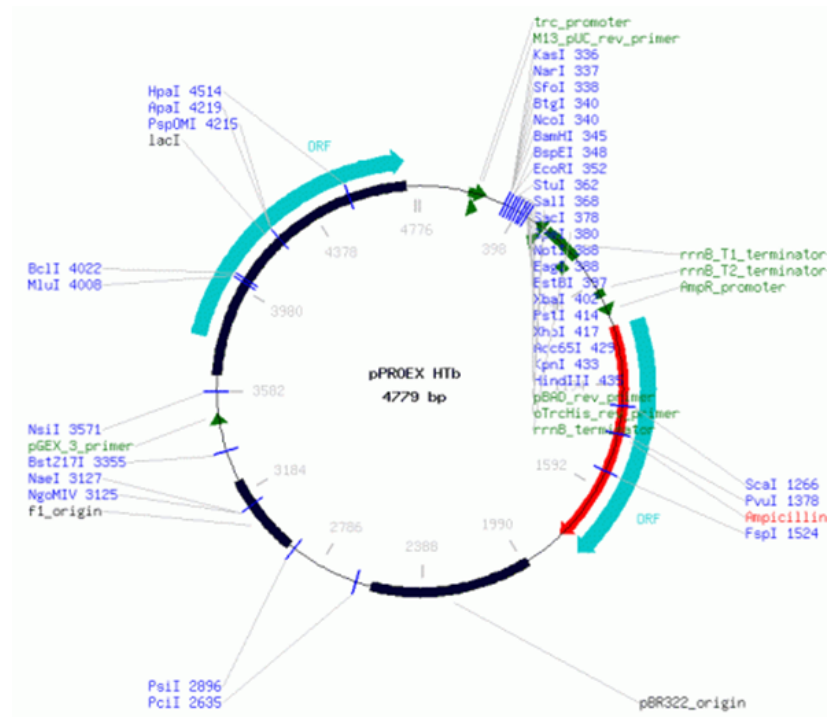


Figure 1 : Carte du vecteur pPROEX-Htb.

Le vecteur d'expression bactérienne pPROEX-Htb permet de cloner le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur trc, inducible à l'IPTG. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et permet le clonage d'une protéine avec une étiquette hexahistidine à l'extrémité N-terminale.

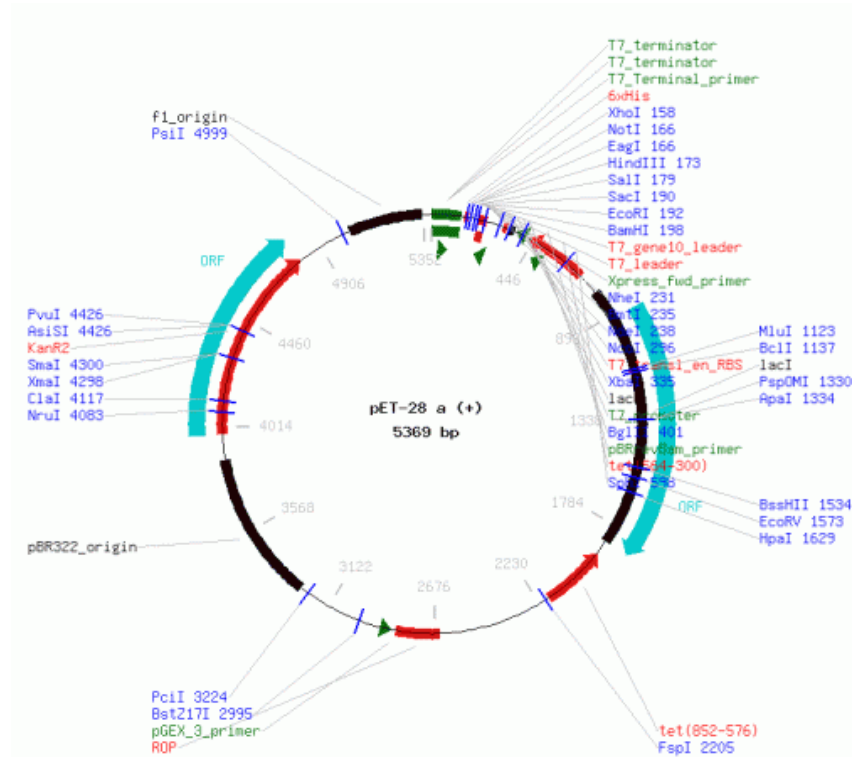


Figure 2 : Carte du vecteur pET-28a.

Le vecteur d'expression bactérienne pET-28a permet de cloner le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7, inducible à l'IPTG. Il possède un gène de résistance à la kanamycine.

## A . Les outils de base

### 1) *La préparation d'ADN plasmidique*

Après transformation, une colonie de bactéries contenant le vecteur d'intérêt est mise en culture dans 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié, pendant une nuit sous agitation. A partir de cette culture, la préparation d'ADN plasmidique est effectuée à l'aide d'un kit commercial NucleSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Le protocole suivi est celui du fournisseur avec en dernière étape, une élution du plasmide par de l'eau ultrapure (MilliQ).

### 2) *L'amplification par PCR*

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) est une technique enzymatique, développée dans les années 1980 (Mullis and Faloona 1987), qui permet de sélectionner et d'amplifier une séquence d'ADN spécifique *in vitro*. Cette réaction est basée sur la répétition de cycles réactionnels comportant 3 étapes : la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation d'amorces spécifiques et l'élongation des amorces par l'ADN polymérase dans le sens 5' - 3'. La préparation du milieu réactionnel et le programme de PCR suivi sont décrits dans le Tableau III. La température d'hybridation est spécifique des amorces utilisées, nous avons ici fait en sorte d'utiliser des amorces ayant une température d'hybridation commune de 68°C.

**A**

Préparation	
Solution	Quantité
ADN matrice	20 ng
Amorce « sens »	2 µl à 100 pmol/µl
Amorce « anti-sens »	2 µl à 100 pmol/µl
Master mix 2X Phusion	25 µl
DMSO	1,5 µl (3% final)
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µl

**B**

Programme de PCR		
Température	durée	
98°C	1'	Cycle x3
72°C	30"	
98°C	30"	Cycle x30
68°C	30"	
72°C	1' par 1000 bp + 2" par cycle	
72°C	10'	
20°C	Sur la nuit	

**Tableau III : Protocole de PCR.**

**A :** Préparation pour la PCR. La réaction est réalisée en parallèle avec et sans DMSO. Le Master mix 2X Phusion fournit par Finnzymes contient l'ADN polymérase Phusion®, le tampon Phusion® GC approprié et 400 µM de chaque dNTP. **B :** Programme de PCR utilisé dans le thermocycleur. Le temps d'élongation est adapté à la longueur de l'ADN, une minute pour 1000 pb environ, la température d'hybridation est spécifique des amorces utilisées.

### 3) *La mutagenèse dirigée*

La mutagenèse dirigée consiste à muter un gène sur une ou quelques bases afin de modifier un ou plusieurs acides aminés de la séquence protéique. Un protocole de mutagenèse mis au point au laboratoire et le kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) ont été utilisés.

#### (a) *Protocole du laboratoire*

La technique de PCR décrite ci-dessus est utilisée avec un protocole adapté (Tableau IV) pour produire les mutations désirées. Les amorces utilisées sont complémentaires de la matrice sauf au niveau de la mutation et s'apparient sur chacun des brins. La polymérase amplifie ensuite entièrement le plasmide portant le gène cible, permettant une amplification exponentielle des deux brins qui porteront ainsi la mutation et pourront se ré-apparier parfaitement.

**A**

Préparation	
Solution	Quantité
ADN matrice	50 ng
Amorce "sens"	150 ng
Amorce "anti-sens"	150 ng
DMSO	1,5 µl
Master Mix 2X Phusion	25 µl
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µl

**B**

Programme		
Température	Durée	
98°C	1'	Cycle x3
72°C	30"	
98°C	30"	Cycle x18
68°C	30"	
72°C	1' par 1000 bp + 2" par cycle	
72°C	10'	

**Tableau IV : Protocole de la réaction de synthèse des brins mutants.**

**A : Préparation pour la réaction.** Elle est réalisée en parallèle avec et sans DMSO. Le Master mix 2X Phusion fournit par Finnzymes. Les amorces contiennent les mutations désirées. **B : Programme de PCR** utilisé dans le thermocycleur. Le temps d'élongation est adapté à la longueur de l'ADN, une minute pour 1000 pb environ, la température d'hybridation est spécifique des amorces utilisées.

Une fois l'amplification de l'ADN effectuée, l'ADN méthylé est digéré par l'enzyme DpnI spécifique de la séquence courte GATC méthylée. La méthylation n'étant portée que par l'ADN issu des bactéries, la digestion par DpnI permet d'éliminer l'ADN matrice non muté. Les produits de la réaction sont incubés 1 heure à 37°C avec 10U de DpnI.

Le mélange réactionnel est ensuite utilisé pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* Top10 afin de sélectionner un plasmide muté.

### (b) Protocole QuickChange II

La mutagenèse est effectuée à l'aide du kit commercial QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Le protocole suivi est celui du fournisseur, qui reste identique à la mutagenèse réalisée avec le protocole du laboratoire (Figure 22). Après l'étape de digestion par la DpnI, l'ADN est inséré dans des bactéries XL1-Blue compétentes (capables de recevoir de l'ADN) par transformation selon le protocole du kit.

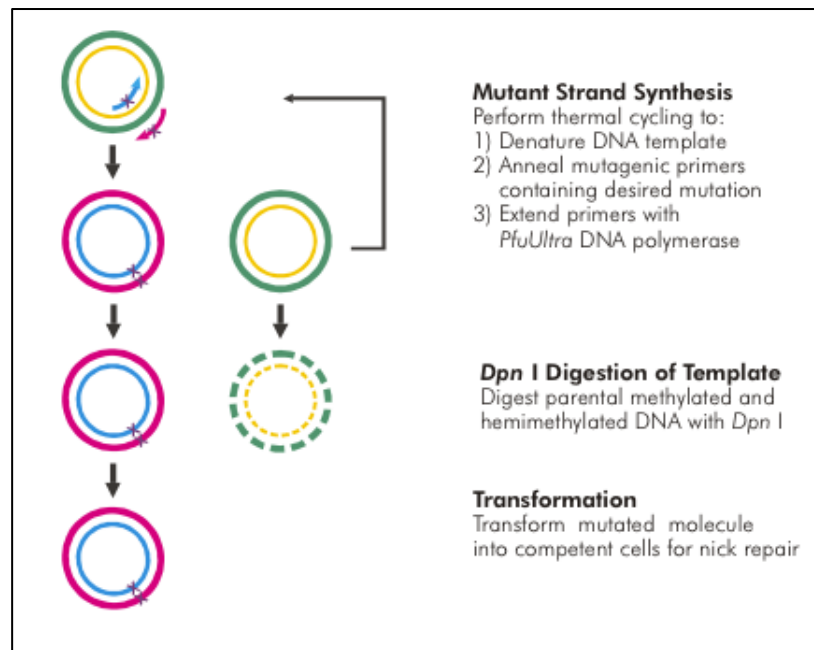


Figure 22 : Schéma de la méthode de mutagenèse dirigée.

Les amorces contenant la mutation désirée sont représentées sous forme de flèches rose et bleu, la mutation est représentée par une croix, les brins matriciels sont représentés en vert et jaune (sous forme de pointillés lorsqu'ils sont digérés) et les nouveaux brins mutés sont en rose et bleu. Extrait du manuel QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies).

### 4) La digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction (le fournisseur est, sauf mention contraire, New England Biolabs, NEB) ont la propriété de reconnaître une séquence spécifique d'ADN et de couper la chaîne ribonucléique au niveau de cette séquence dite de restriction. La digestion permet de linéariser un vecteur afin de cloner un gène, digéré lui aussi par des enzymes de restriction, ayant des extrémités complémentaires.

L'ADN purifié est digéré par une enzyme de restriction dans son tampon optimal (le tampon NEB4 a été utilisé pour toutes les digestions). Lorsque l'ADN doit être digéré par deux enzymes différentes, on peut effectuer ces digestions l'une après l'autre ou bien réaliser une double digestion c'est à dire avec les deux enzymes ajoutées simultanément au milieu

réactionnel. Le choix du tampon pour cette double digestion est important, il doit convenir aux deux enzymes, il se fait suivant les recommandations du fournisseur. Selon les spécificités de chaque enzyme, le milieu peut être supplémenté avec de la BSA (Bovine Serum Albumine) (Tableau V). Le mélange réactionnel est incubé à température optimale d'action de l'enzyme pendant au moins 1 heure.

Solution	Quantité
ADN	50 ng à 2 µg
Tampon Optimal (4)	2 µl
<i>BSA 10 mg/ml</i>	<i>0,2 µl</i>
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µl
Enzyme(s) de restriction	0,5 à 1 µl

**Tableau V : Protocole de digestion par les enzymes de restriction.**

Le choix du tampon optimal et de l'ajout ou non de BSA se fait selon les recommandations du fournisseur. Dans le cas des double-digestions, les deux enzymes sont ajoutées simultanément.

### **5) La Ligation**

Les fragments d'ADN et les vecteurs linéarisés par restriction doivent être introduits dans un plasmide ou vecteur d'expression. La T4 DNA ligase permet, en présence d'ATP, de joindre les extrémités de la chaîne désoxyribonucléique.

La ligation du vecteur avec l'insert se fait avec un rapport molaire vecteur/insert de 1/3, la préparation vecteur/insert est appelée ADNmix. Le mélange réactionnel de ligation est laissé à incuber 5 minutes à température ambiante puis stocké dans la glace avant d'être inséré par transformation dans des bactéries compétentes *E. coli* Top10.

Solution	Quantité
ADNmix	5 µl
Quick ligation buffer 2X	5 µl
Quick T4 DNA Ligase	0,5 µl

**Tableau VI : Mélange réactionnel pour la ligation d'ADN.**

L'ADNmix correspond au mélange du vecteur et de l'insert avec un rapport molaire 1/3. La Quick T4 DNA Ligase et le Quick ligation buffer 2X sont fournis par NEB.

### ***6) La transformation bactérienne par choc thermique***

La transformation bactérienne permet de faire pénétrer, sans intégration génomique, un ADN plasmidique dans une bactérie qui a été préalablement rendue compétente grâce à l'utilisation du chlorure de calcium. Un à 10 ng de plasmide incubés sur la glace pendant 20 minutes avec 100 µl de bactéries compétentes avant de subir un choc thermique d'une minute et trente secondes à 42°C suivi de deux minutes sur la glace. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation avec 400 µl de milieu LB. Les cultures sont étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB-agar avec l'antibiotique adéquat, et mises à incuber à 37°C sur la nuit.

Dans le cas de co-transformation, les plasmides des deux gènes désirés sont insérés en même temps dans la bactérie en ajoutant les deux plasmides aux bactéries compétentes.

## **B . Clonage des fragments de Elmo1**

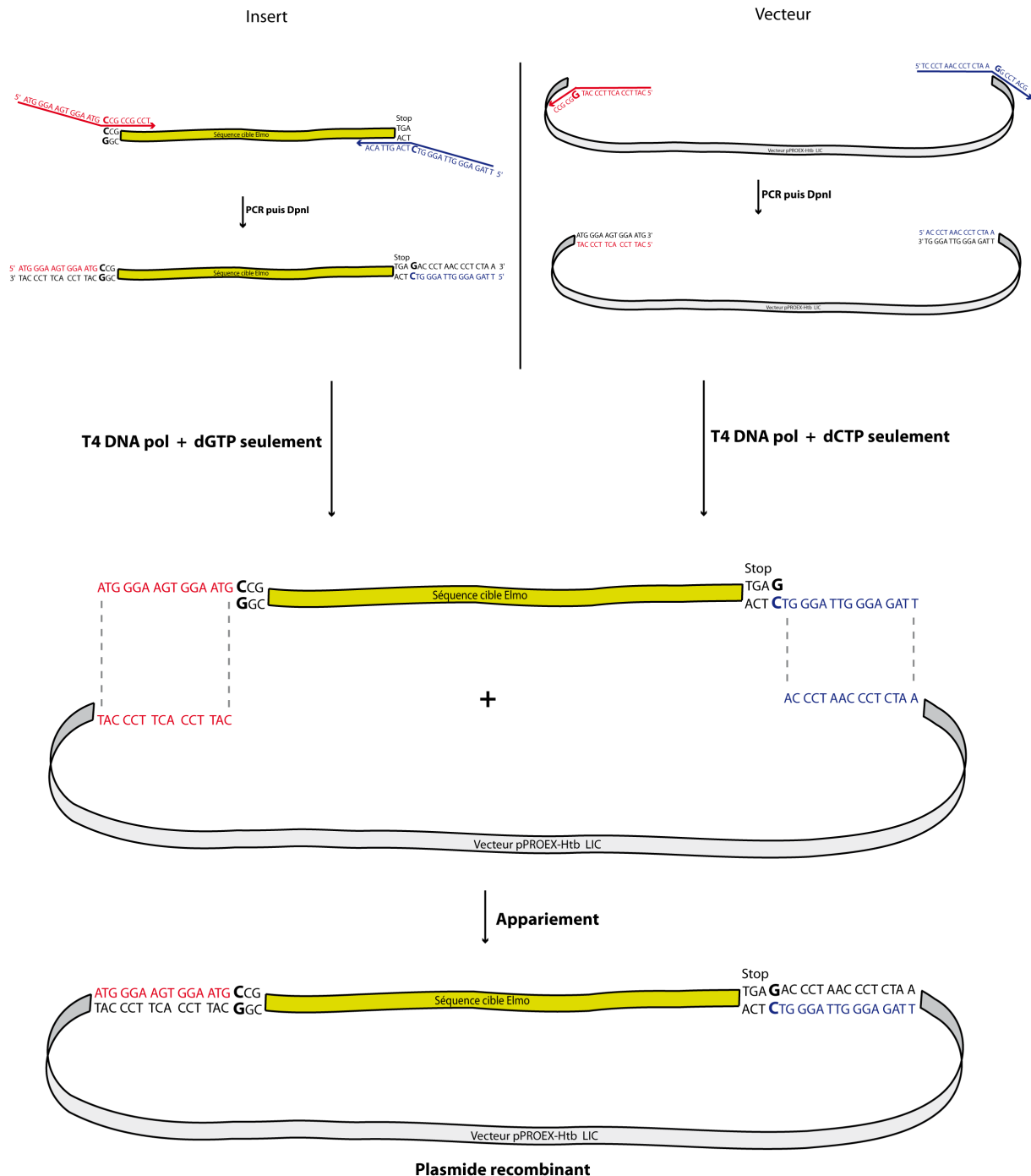
Nous avons mis en place une stratégie de production de fragments de Elmo1 pour tenter d'étudier le rôle de chacun dans l'interaction avec Dock. Les sites de coupures ont été définis grâce à une approche de protéolyse ménagée mise en place au laboratoire avant mon arrivée. Plusieurs sites préférentiels de clivage ont ainsi été mis en évidence. Ces fragments sont produits par la méthode de Ligation Independent Cloning (LIC) détaillée dans le paragraphe suivant. D'autres fragments, ayant une extrémité C-terminale plus courte ont été obtenus par mutagenèse dirigée.

### ***1) Méthode LIC***

#### ***(a) Principe :***

La technique LIC a été utilisée pour sous-cloner des fragments de la protéine Elmo1 dans le vecteur pPROEX-HTb (Aslanidis and de Jong 1990). Cette technique n'utilise ni enzyme de restriction ni ligase, ce qui permet d'effectuer facilement et rapidement plusieurs clonages en parallèle. Le principe est d'utiliser l'activité exonucléase 3'-5' de la T4 DNA polymérase en absence d'un nucléotide libre (dNTP). Cette technique permet de générer des extrémités libres de part et d'autre de l'insert et du vecteur complémentaires qui leur permettront de s'apparier.





**Figure 23 : Stratégie de clonage LIC.**

L'insert et le vecteur sont traités séparément, une PCR permet d'ajouter des extrémités complémentaires « LIC ». La T4 DNA polymérase crée des extrémités flottantes qui vont leur permettre de s'apparier.

Des séquences, appelées LIC sont ajoutées par PCR classique (en page 82) aux extrémités du gène d'intérêt. Ces séquences sont optimisées de façon à omettre une base (par exemple G) et à ne comporter que les trois autres (donc A, C et T). Les extrémités LIC flottantes sont obtenues grâce à l'action exonucléase de la T4 DNA polymérase et en présence

seule du nucléotide omis dans la séquence LIC (G). La T4 DNA polymérase va alors digérer les extrémités jusqu'à rencontrer le premier nucléotide (G) de la séquence et rester bloquée entre son action exonucléase et polymérase à cette position. Les extrémités flottantes aux extrémités du vecteur sont produites de la même manière mais avec la base complémentaire (ici C).

L'insert et le vecteur sont ensuite mélangés afin que leurs séquences simple brin respectives s'apparient (Figure 23). Le vecteur linéaire comporte deux séquences différentes : il ne peut pas se re-circulariser.

Après une étape de transformation, la réaction finale de réparation sera réalisée dans la bactérie par l'activité d'auto-réparation de sa T4 DNA ligase. Les constructions présentent dans les clones qui ont été cultivés sur boîte de pétri seront analysées par PCR de contrôle et séquençage (Eurofins-MWG).

Cette technique a été importée et mise au point au laboratoire par Julien Perard en 2006 pendant son stage de master avant que je ne l'applique à la production des fragments de Elmo1.

### ***(b) Préparation des vecteurs et des inserts :***

Les fragments de Elmo1 sont construits à partir de la construction de Elmo1 qui a été sous-clonée dans le plasmide pPROEX-Htb auparavant. Pour chaque construction de fragment, le vecteur pPROEX-Htb et le gène codant pour Elmo1 sont amplifiés par PCR (en page 82) grâce aux amorces correspondantes contenant la séquence LIC (Tableau VII).

L'amplification est contrôlée par migration sur gel d'agarose 1%. Les produits de PCR sont purifiés par extraction du gel grâce au kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) et une élution avec 50 µl d'eau. L'ADN extrait est ensuite digéré par l'enzyme DpnI pendant 1 heure à 37°C pour éliminer l'ADN matrice utilisé pour la PCR dans du tampon Tango (Fermentas). L'ADN est purifié grâce au kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) et une élution avec 50 µl d'eau puis digéré pendant 1 heure à 37°C par la T4 DNA polymérase (Fermentas) dans son tampon spécifique, T4 DNA polymerase Buffer (Fermentas), supplémenté par 4 µl de BSA à 100 mg/ml, et 8 µl de dCTP (pour le vecteur) ou 8 µl de dGTP (pour les inserts de Elmo1). L'enzyme est ensuite inactivée par dénaturation à 70°C pendant 10 minutes. Le produit de la digestion est purifié par NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), et le résultat est analysé par migration sur gel d'agarose 1%. Les quantités d'ADN produites sont évaluées sur gel d'agarose en comparant avec la quantité de marqueurs déposés.

Nom	Séquence 5'→3'
Elmo1-1-for	ATGGGAAGTGGAATGCCGCCCTTCGGACATCGTG
Elmo1-146-for	ATGGGAAGTGGAATGATTATGAAGCCCTGCTTTGGAGACA
Elmo1-350-for	ATGGGAAGTGGAATGTCCATGTACACTCGGGATTATAAAAAA
Elmo1-532-for	ATGGGAAGTGGAATGCCGATTTTGGAACTAAAGGAGAAGATC
Elmo1-146-rev	TTAGAGGGTTAGGGTCTCAAATCTTCTGCAACTTCTGGT
Elmo1-350-rev	TTAGAGGGTTAGGGTCTCAGGACTTGCGTTTCTCCA
Elmo1-532-rev	TTAGAGGGTTAGGGTCTCACGGGCGAGACTGGAAATCTT
Elmo1-675-rev	TTAGAGGGTTAGGGTCTCACTTCCCAAGCAGTGCATTACAG
Elmo1-727-rev	TTAGAGGGTTAGGGTCTCAGTTACAGTCATAGACAAA
F-pProExHTb LIC	TCCCTAACCTCTAAGGCCTACGTCGACGAGCTC
R-pProExHTb LIC	CATTCCACTTCCCATGGCGCCCTGAAAATACAG

**Tableau VII : Liste des amorces utilisées pour le clonage LIC des fragments de Elmo1.**

Le clonage des inserts de Elmo1 dans le vecteur pPROEX-Htb est réalisé avec un rapport molaire (insert :vecteur) 1:1 dans du tampon 25 mM Tris-HCl pH7,8 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 4 mM β-mercaptoéthanol ; 0,25 mM ATP. Le mélange réactionnel est incubé 1 heure à 37°C puis inséré par transformation (en page 86) dans des bactéries compétentes *E. coli* Top10.

Grâce à cette technique, 14 constructions de Elmo1 ont pu être clonées (Tableau II). Ces différentes constructions permettront ainsi d'étudier la structure et le rôle de chaque domaine de Elmo1 dans l'interaction avec Dock.

## ***2) Mutagenèse dirigée***

Il nous a semblé utile de disposer de nouveaux fragments de Elmo1 pour étudier le rôle de la région C-terminale dans l'interaction avec Dock. Nous avons donc produit deux nouveaux fragments dont on a supprimé le motif PxxP en C-terminal, les protéines ElmoΔPxxP et ElmoΔNΔPxxP (Tableau II). Une mutagenèse dirigée (en page 84) grâce au kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) a permis d'insérer un codon STOP après le codon 707 (Figure 24). Les amorces utilisées pour cette mutagenèse sont décrites dans le Tableau VIII.

Nom	Séquence 5'→3'
For Elmo707Stop	AAACATCCAGATCCCGTAAAGCACCTCCGCCTATCC
Rev Elmo707Stop	GGATAGGCGGAGGTGCTTACGGGATCTGGATGTTT

**Tableau VIII : Liste des amorces pour produire ElmoΔPxxP et ElmoΔNΔPxxP.**

Ces amorces permettent la mutation de 2 résidus pour insérer un codon STOP après le codon 707 de la séquence de Elmo1.



**Figure 24 : Stratégie de mutagenèse dirigée pour insérer un codon STOP.**

Deux bases sont modifiées dans la séquence de Elmo1 codant pour le résidu 708 pour être transformé en codon STOP.

## C . Constructions pour l'analyse par SPR

La résonance plasmonique de surface (SPR) a été utilisée pour étudier l'interaction entre Elmo1 et Dock1 (en page 113). Cette technique nécessite d'immobiliser un des partenaires sur une surface. Dans le but d'orienter la fixation de cette protéine, nous avons mis au point deux stratégies se basant sur l'interaction entre une étiquette spécifique et un ligand préalablement immobilisé sur la surface. La première s'appuie sur l'interaction histidine/  $\text{Ni}^{2+}$ , et la seconde sur l'interaction Biotine/Streptavidine. De nouvelles constructions de protéines ont ainsi été réalisées grâce à des méthodes de mutagenèse dirigée.

### *1) Etiquette décahistidine sur Elmo1*

Tous les fragments de Elmo1 construits possèdent une étiquette hexahistidine qui leur permet de se fixer sur une surface chargée en  $\text{Ni}^{2+}$ . Nous avons donc essayé d'immobiliser Elmo1 sur une puce NTA (GE Healthcare) chargée en  $\text{Ni}^{2+}$ , mais cette interaction s'est avérée trop faible (en page 118). On a pu observer une décroche de Elmo1 faisant perdre plus de 10% de la réponse. Il a été montré qu'une étiquette décahistidine ou deux étiquettes hexahistidine pouvaient être bénéfiques pour immobiliser une protéine sur une surface de façon stable (Nieba, Nieba-Axmann et al. 1997). Nous avons mis en place deux méthodes pour insérer cette étiquette décahistidine.

**(a) Méthode 1 : Mutagenèse dirigée : insertion de 4 histidines**

L'étiquette décahistidine est créée en insérant en 5' de l'étiquette hexahistidine une séquence codant pour 4 histidines supplémentaires (Figure 25). Deux méthodes ont été utilisées pour créer cette insertion : un protocole de mutagenèse mis au point au laboratoire et le kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) (en page 83). Les amorces utilisées dans les deux cas sont présentées dans le Tableau IX.



**Figure 25 : Stratégie de mutagenèse dirigée pour insérer 4 histidines.**

Nom	Séquence 5'->3'
10HisElmo1For	CAGACCATGTCGTACTAC <b>CACCACCACCAC</b> CATCACCATCACCATCAC
10HisElmo1Rev	GTGATGGTGATGGTGATG <b>GTTGGTGGTGGT</b> GTAGTACGACATGGTCTG

**Tableau IX : Liste des amorces pour l'insertion de l'étiquette décahistidine, méthode 1.**

Les amorces permettent d'insérer une séquence codant pour 4 histidines supplémentaires (en rose) à côté des six histidines de l'étiquette hexahistidine déjà présente.

**(b) Méthode 2 : clonage d'un insert contenant une étiquette décahistidine**

La modification de l'étiquette poly-histidine se fait en deux étapes. La première consiste à supprimer la partie du gène codant pour l'étiquette hexahistidine tout en insérant un site de coupure pour l'enzyme *NheI* (Figure 26) et la seconde étape permet d'insérer une nouvelle étiquette décahistidine (Tableau XI) par clonage dans le site de restriction *NheI* nouvellement créé. L'insert possède les sites de restriction *XbaI* et *NheI* compatibles à ses extrémités qui permettront d'orienter le clonage.

L'étape de suppression et de mutation est faite grâce au kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) (en page 84). Les amorces utilisées pour supprimer les 75 paires de bases et insérer les 6 paires de bases constituant le site de restriction *NheI* sont détaillées dans le Tableau X.



**Figure 26 : Stratégie de mutagenèse pour supprimer l'étiquette hexahistidine.**

La mutagenèse permet de supprimer toute l'étiquette N-terminale de la protéine Elmo1, tout en insérant un site de restriction (en orange) pour l'enzyme *NheI*.

Nom	Séquence 5'→3'
Elmo10HisBis-For	CACAGGAAACAGACCATG <b>GCTAGC</b> GGAATGCCGCCGCCTTCG
Elmo10HisBis-Rev	CGAAGGCGGCGGCATTCC <b>GCTAGC</b> CATGGTCTGTTTCCTGTG

**Tableau X : Liste des amorces pour l'insertion de l'étiquette décahistidine, méthode 2.**

Les amorces permettent d'une part de supprimer toute la région codant pour l'étiquette hexahistidine présente (75bp), et d'autre part de modifier des bases pour insérer un site de restriction pour *NheI* (en orange).

Nom	Séquence 5'→3'
InsertElmo10HFor	GCT <b>CTAG</b> ACCAATCACCATCACCATCACCATCACCATGATTACGATATCCC AACGACCG <b>GCTAGC</b> CGCG
InsertElmo10HRev	CGCGCG <b>GCTAGC</b> GGTCGTTGGGATATCGTAATCATGGTGATGGTGATGGTGAT GGTGATGGTG <b>CTAG</b> AGC

**Tableau XI : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin.**

Insert contenant la séquence d'une étiquette décahistidines (en vert) et les sites de restriction *NheI* (en orange) et *XbaI* (en rose) pour pouvoir être inséré dans le vecteur pPROEX-Htb-Elmo1 préparé comme décrit au-dessus.

L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié par le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) puis les constructions sont vérifiées par séquençage nucléotidique (MWG).

Bien que les résultats de séquençage soient positifs, nous n'avons pas finalisé cette méthode car nous avons réussi entre-temps à orienter la fixation de nos protéines sur les surfaces de SPR grâce à une étiquette de biotinylation (ci-dessous).

## 2) *Etiquette de biotinylation*

La streptavidine présente une très forte affinité pour la biotine. Les protéines biotinylées peuvent être fixées sur les surfaces chargées en streptavidine de façon extrêmement stable sur la surface. Nous décrivons ici l'insertion d'une étiquette dont la séquence sera reconnue par la protéine BirA (Biotin Ligase) de *E. coli* qui va pouvoir y fixer covalamment une biotine. Cette étiquette de biotinylation sera insérée à l'extrémité N-terminale des fragments de Elmo1 et à l'extrémité C-terminale de la protéine SH3<sub>1</sub>.

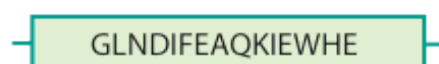


Figure 27 : Séquence protéique de l'étiquette de biotinylation. D'après Avidity Avitag™ (Avidity).

### (a) *Insertion sur domaine SH3<sub>1</sub>*

Afin d'insérer une étiquette de biotinylation à l'extrémité C-terminale de SH3<sub>1</sub>, il faut tout d'abord supprimer les codons STOP présents dans sa séquence puis insérer par clonage entre les sites *EcoRI* et *SacI* présents, un insert contenant la séquence codant pour l'étiquette de biotinylation ainsi qu'un nouveau codon STOP en 3'.

#### (i) *Préparation du vecteur*

La suppression du codon STOP a été faite par mutagenèse dirigée (Figure 28) avec les amorces décrites dans le Tableau XII, grâce au kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) (en page 84).

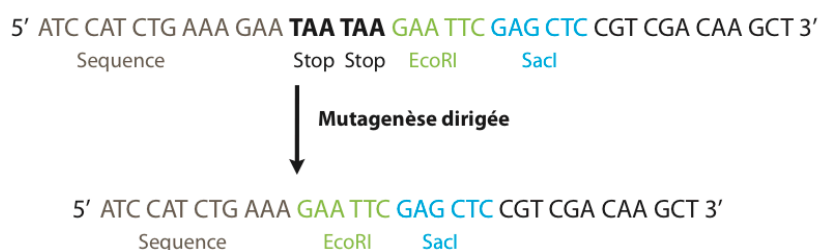


Figure 28 : Stratégie de mutagenèse dirigée pour supprimer les deux codons STOP.

Nom	Séquence 5'→3'
SH3-CterBiot-For	GCGAGCTATATCCATCTGAAAGAATTCGAGCTCCGT
SH3-CterBiot-Rev	CGACGGAGCTCGAATTCTTTTCAGATGGATATAGCTC

Tableau XII : Liste des amorces pour la suppression du codon STOP du vecteur.

L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié grâce au kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) (en page 82) puis les constructions sont vérifiées par séquençage nucléotidique (MWG).

L'ADN des constructions correctes est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *SacI*-HF (Tableau V). Le produit de la digestion est analysé par migration sur gel d'agarose 1%, puis purifié par le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). L'élution est effectuée avec 20 µl d'eau distillée.

L'ADN est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*-HF (en page 84), puis l'enzyme est inactivée par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes.

L'ADN est déphosphorylé par la Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Roche) pour éviter que le plasmide ainsi linéarisé ne se referme sur lui-même (Tableau XIII). Le mélange réactionnel est mis à incuber pendant 10 minutes à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes. L'ADN du vecteur est conservé dans la glace jusqu'à l'étape de ligature.

Solution	Quantité
ADN	8 µl
Tampon 10X	1 µl
H <sub>2</sub> O	qsp 10 µl
SAP	1µl

**Tableau XIII : Composition du milieu réactionnel de déphosphorylation de l'ADN par la SAP.**  
Le tampon 10X et la SAP sont fournis par Roche.

## (ii) Préparation de l'insert

L'insert contenant la séquence de l'étiquette de biotinylation et les sites de restrictions *SacI* et *EcoRI* a été synthétisé sous forme d'ADN simple brin (MWG), la séquence de chaque brin est décrite dans le (Tableau XIV). L'appariement des brins complémentaires a été effectué dans un mélange réactionnel contenant du tampon NEB4 par 5 cycles de dénaturation à 95°C – renaturation à 68°C (Tableau XV).

L'insert double brin est digéré simultanément par les enzymes de restriction *SacI*-HF et *EcoRI*-HF (en page 84). Les enzymes sont ensuite inactivées par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes.



Nom	Séquence 5'→3'
InsertSH3BiotFor	CGAATTCGGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGG CACGAATAATAATAGGAGCTCGCGGG
InsertSH3BiotRev	CCCGCGAGCTCCTATTATTATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGAT GTCGTTTCAGACCGCCACCGAATTCG

**Tableau XIV : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin.**

L'insert contient une étiquette de biotinylation (en violet), deux nouveau codons STOP (en gras) et les sites de restriction pour les enzymes *EcoRI* (en vert) et *SacI* (en bleu).

Solution	Quantité
Insert « sens »	120 ng
Insert « anti-sens »	120 ng
Tampon NEB4	2 µl
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µl

**Tableau XV : Composition du milieu réactionnel pour l'appariement de l'insert contenant une étiquette de biotinylation.**

### (iii) Clonage direct de l'insert

L'insert et le vecteur sont appariés grâce à une réaction de ligation (en page 85) avant d'être transformés dans des bactéries *E. coli* Top10. L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié par NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) (en page 82). La bonne insertion des sites de restriction désirés est contrôlée par séquençage (Eurofins-MWG). Malheureusement, cette méthode n'a pas donné de clone positif, une seconde méthode a donc été utilisée.

### (iv) Insertion avec sous clonage en TOPO

L'insert double brin a été sous-cloné au préalable dans le vecteur pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO® grâce au kit zero Blunt® TOPO® PCR Cloning kit (Invitrogen) (Figure 29). Une première double digestion par BamHI et XhoI permet de découper un fragment de 160 bp contenant l'insert, qui est purifié en utilisant le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). Après une migration sur gel d'agarose 2%, ce fragment d'ADN est à son tour double digéré par *SacI* et *EcoRI* afin de récupérer l'insert avec des extrémités cohésives qui pourront s'apparier avec le vecteur. Les enzymes sont ensuite inactivées par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes.

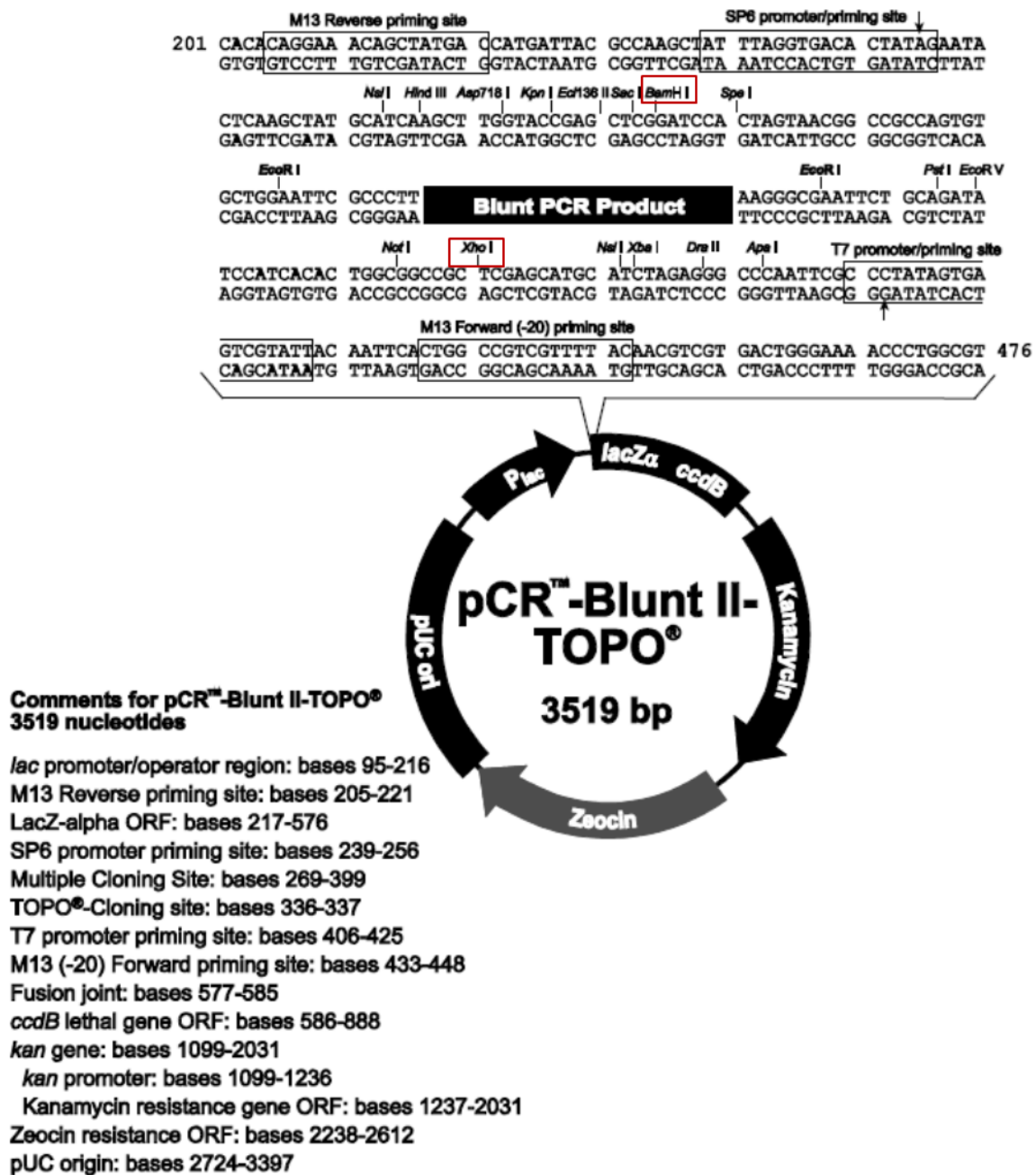


Figure 29 : Carte du vecteur pCR™-Blunt II-TOPO (Invitrogen).

L'insert est sous-cloné dans le vecteur pCR™-Blunt II-TOPO. Les sites de restriction des enzymes BamHI et XhoI utilisées pour le découper sont encadrés en rouge. Extrait du manuel du kit.

L'insert et le vecteur sont appariés grâce à une réaction de ligation (en page 85) avant d'être transformés dans des bactéries *E. coli* Top10 (en page 86). L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié par NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) (en page 82). La bonne insertion de l'étiquette de biotinylation est contrôlée par séquençage nucléotidique (MWG).

## **(b) Insertion sur la protéine Elmo :**

### **(i) Préparation du vecteur**

L'étiquette de biotinylation est insérée entre le site de clivage à la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) et le début de la séquence codant pour la protéine ElmoWT ainsi que pour les fragments Elmo $\Delta$ C, Elmo $\Delta$ N et ElmoPH. Deux sites de restriction doivent être créés. Nous avons tout d'abord essayé de créer ces deux sites de restriction en une seule étape de mutagenèse dirigée sans succès, puis en deux étapes successives de mutagenèse dirigée (Figure 30).

#### **• Mutagenèse dirigée en une étape**

La mutation des bases est faite par mutagenèse dirigée (Figure 28) avec les amorces décrites dans le Tableau XVI grâce au kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) (en page 84).

Nom	Séquence 5'→3'
ForElmoBiot	CCTGTATTTTCAGGGC <b>GACGTC</b> GG <b>CCGCGG</b> AATGCCGCCGCCTTCGG
RevElmoBiot	CCGAAGGCGGCGGCATT <b>CCGCGG</b> CC <b>GACGTC</b> GCCCTGAAAATACAGG

**Tableau XVI : Liste des amorces pour la mutagenèse en une seule étape.**

Les amorces contiennent les sites de restrictions pour *Aat*II (en rouge) et *Sac*II (en rose), correspondant à la mutation de 6 bases.

L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié grâce au kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) (en page 82) puis les constructions sont vérifiées par séquençage nucléotidique (Eurofins-MWG). Malheureusement tous les clones testés se sont révélés négatifs.

#### **• Mutagenèse dirigée en deux étapes**

Les mutagenèses dirigées ont été effectuées avec le kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) (en page 84) en utilisant les amorces adéquates présentées dans le Tableau XVII en suivant la stratégie décrite dans la Figure 30.

L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié par NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). La bonne insertion des sites de restriction désirés est contrôlée par un test de digestion avec les enzymes appropriées et analysé par migration sur gel d'agarose 1%. Une vérification par séquençage nucléotidique a tout de même été effectuée.



**Figure 30 : Stratégie de mutagenèse pour insérer une étiquette de biotinylation en N-terminal de Elmo.** Les sites de restriction *AatII* et *SacII* sont créés en deux étapes de mutagenèse en vue d'insérer l'étiquette.

Nom	Séquence 5'→3'
Elmo <i>AatII</i> For	CCTGTATTTTCAGGGCGACGTCGGAAGTGGAATGCCGCC
Elmo <i>AatII</i> Rev	GGCGGCATTCCACTTCCGACGTCGCCCTGAAAATACAGG
Elmo <i>SacII</i> For	CAGGGCGACGTCGGCCGCGGAATGCCGCCGCC
Elmo <i>SacII</i> Rev	GGCGGCAGGCATTCCGCGGCCGACGTCGCCCTG

**Tableau XVII : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse en deux étapes.**

Les amorces permettent d'insérer de façon séquentielle les sites de restriction *AatII* (en rouge) puis *SacII* (en rose).

L'ADN des constructions correctes est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *AatII* (Tableau V). Le produit de la digestion est analysé par migration sur gel d'agarose 1%, puis purifié par le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). L'élution est effectuée avec 20 µl d'eau distillée.

L'ADN est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *SacII* (en page 84), puis l'enzyme est inactivée par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes.

L'ADN est déphosphorylé par la Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Roche) pour éviter que le plasmide ainsi linéarisé ne se referme sur lui-même (Tableau XVIII). Le mélange réactionnel est mis à incuber pendant 10 minutes à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par dénaturation à 65°C pendant 15 minutes. L'ADN du vecteur est conservé dans la glace jusqu'à l'étape de ligation.

Solution	Quantité
ADN	8 µl
Tampon 10X	1 µl
H <sub>2</sub> O	qsp 10 µl
SAP	1 µl

**Tableau XVIII : Composition du milieu réactionnel de déphosphorylation de l'ADN par la SAP.**  
Le tampon 10X et la SAP sont fournis par Roche.

## (ii) Préparation de l'insert

L'insert contenant la séquence de l'étiquette de biotinylation et les sites de restrictions *AatII* et *SacII* a été synthétisé sous forme d'ADN simple brin (Eurofins-MWG), la séquence de chaque brin est décrite dans le Tableau XIX. L'appariement des brins a été effectué dans un mélange réactionnel contenant du tampon NEB4 par 5 cycles de dénaturation à 95°C – renaturation à 68°C (Tableau XX).

Nom	Séquence 5'→3'
FoInserBiotElmo	GGCGC <b>GACGTC</b> GGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCG AATGGCACGA <b>ACCGCGG</b> GTACA
ReInserBiotElmo	TGTAC <b>CCGCGGTT</b> CGTGCCATTTCGATTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTCA GACCGCCACCG <b>GACGTC</b> GCGCC

**Tableau XIX : Séquence de l'insert sous forme d'ADN simple brin.**  
L'insert contient une étiquette de biotinylation (en violet) et les sites de restriction pour les enzymes *AatII* (en rouge) et *SacII* (en rose).

Solution	Quantité
Insert « sens »	120 ng
Insert « anti-sens »	120 ng
Tampon NEB4	2 µl
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µl

**Tableau XX : Composition du milieu réactionnel pour l'appariement de l'insert contenant une étiquette de biotinylation.**

L'insert double brin est digéré simultanément par les enzymes de restriction *AatII* et *SacII* (en page 84). Les enzymes sont ensuite inactivées par dénaturation à 65°C pendant 20 minutes.

### (iii) Clonage direct de l'insert

L'insert et le vecteur sont appariés grâce à une réaction de ligation (en page 85) avant d'être transformés dans des bactéries *E. coli* Top10. L'ADN plasmidique présent dans les clones transformés est purifié par NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) (en page 82). La bonne insertion de l'étiquette de biotinylation est contrôlée par séquençage nucléotidique (MWG).

### (iv) Problème de cadre de lecture

Toutefois, l'insertion de l'étiquette de biotinylation n'est pas en phase avec la séquence des protéines : un décalage dans le cadre de lecture a été introduit en même temps que l'étiquette de biotinylation. Une étape de mutagenèse dirigée grâce au kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) avec les amorces présentées dans le Tableau XXI permet de résoudre ce problème.

Nom	Séquence 5'→3'
For ElmoPhase+2	CAGAAAATCGAATGGCACGAAGCCCGCGGAATGC
Rev ElmoPhase+2	GCATTCCGCGGGCTTCGTGCCATTTCGATTTCTG

**Tableau XXI : Liste des amorces utilisées pour retrouver le cadre de lecture original.**

Les amorces permettent de rajouter deux bases afin de retrouver le cadre de lecture de la séquence de Elmo.

## II . Production des protéines

Les différentes protéines étudiées sont surexprimées en système bactérien avant d'être purifiées. Les méthodes de purification utilisées dépendant des caractéristiques de chaque protéine, nous allons les détailler ici.

### A . Surexpression des protéines

A partir des souches bactériennes BL21(DE3) transformées avec le vecteur contenant le gène d'intérêt (en page 86), des précultures à saturation sont réalisées dans du milieu LB contenant le ou les antibiotiques appropriés à 37°C sous agitation pendant la nuit. Des cultures sont inoculées au 1/50<sup>ème</sup> à partir des cultures à saturation dans du milieu LB-antibiotique à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,6 et 0,8. L'expression de la protéine est alors induite par ajout de 1mM d'IPTG pendant 3 heures à 37°C (sauf pour la protéine ElmoPH, pendant 5 heures à 30°C). Les cultures sont centrifugées à 5000g pendant 20 minutes puis les culots bactériens sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

#### *1) Extraction cellulaire des protéines solubles*

Toutes les constructions de la protéine Elmo1 sont produites sous forme de protéines solubles. Le culot bactérien est repris dans du tampon de lyse PBS (25 mM Phosphate de sodium pH8, 140 mM NaCl, 10 mM KCl) à raison de 20 ml pour 1l de culture initiale, supplémenté par de la DNase (Sigma) à 25 µg/ml, 1 mM MgCl<sub>2</sub> et d'un cocktail anti-protéases (Complete®, Roche Diagnostics). L'extraction se fait par lyse mécanique à la presse de French, au Microfluidizer® (microfluidics) ou au sonicateur. Les protéines solubles sont récupérées dans la fraction soluble après une centrifugation à 4°C pendant 45 minutes à 45000 g, puis filtrées sur une membrane de nitrocellulose de 0,22 µm.

Les complexes formés des différentes constructions de Elmo1 avec la protéine SH3-Ha sont extraits sous forme soluble selon le même protocole que précédemment dans un tampon de lyse contenant 50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl.

La protéine GST-SH3<sub>1</sub> est elle aussi exprimée sous forme soluble, et extraite selon le même protocole que précédemment dans un tampon contenant 50 mM Tris pH8, 20 mM NaCl et 5 mM DTT supplémenté en PMSF 0,5 mM.

## **2) Extraction cellulaire des protéines sous forme de corps d'inclusion**

Les autres constructions de SH3<sub>1</sub> utilisées n'ont pas permis de produire les protéines sous forme soluble, elles sont donc exprimées sous forme d'agrégats insolubles appelés corps d'inclusion. Le culot bactérien est repris dans un tampon contenant 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl supplémenté avec 25 µg/ml de DNase (Sigma). L'extraction cellulaire est réalisée par casse mécanique à l'aide de billes de silice et d'agitation en utilisant un système FastPrep® (MP biochemicals). Les corps d'inclusion sont récupérés par élimination de la fraction soluble après centrifugation à 4°C pendant 45 minutes à 45000g.

## **B . Purification des protéines**

Les différentes protéines sont purifiées par des chromatographies à l'aide d'un système FPLC Äkta Purifier à un débit de 1 ml/min. Les fractions d'élution sont collectées et analysées par SDS-PAGE.

### **1) Constructions de Elmo et complexes Elmo/Dock**

Les protéines sont produites avec une étiquette hexahistidine à l'extrémité N-terminale qui permet de faire une première étape de purification par chromatographie d'affinité sur une résine de Nickel. Les différentes formes oligomériques sont ensuite séparées par chromatographie d'exclusion de taille.

#### **(a) Chromatographie d'affinité au Nickel**

Le surnageant de l'extraction cellulaire est chargé sur une colonne Ni-NTA (Qiagen) de 5 ml préalablement équilibrée dans du tampon PBS pH8. La colonne est ensuite lavée avec un volume de tampon PBS équivalent à 10 fois le volume de la colonne. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 0% à 40% d'imidazole 0,5 M. La compétition pour s'accrocher au Nickel entre l'imidazole et les étiquettes hexahistidine permet l'élution des protéines.

#### **(i) Clivage de l'étiquette hexahistidine**

Dans le but de cristalliser une protéine il est souvent nécessaire de supprimer l'étiquette poly-histidine. Les parties flexibles des protéines sont généralement défavorables à la nucléation et à la croissance cristalline. Les différentes constructions de Elmo1 possèdent un site de reconnaissance pour la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) entre l'étiquette



hexahistidine et le début de la séquence de la protéine. Les fractions issues de la purification et contenant la protéine d'intérêt sont regroupées puis dialysées toute la nuit à 4°C contre du tampon PBS pH8 en présence de protéase TEV à un ratio massique 1 : 10 (TEV : HisProtéine). Afin de séparer les protéines correctement clivées des protéines possédant encore leur étiquette poly-histidine, une deuxième chromatographie d'affinité sur une colonne NiNTA est effectuée. Les protéines dont l'étiquette a correctement été clivée ne doivent pas ou moins bien se lier à la colonne et se retrouvent éluées à un volume différent des protéines possédant encore l'étiquette, les différentes fractions d'élution sont analysées sur gel SDS-PAGE. La TEV est également produite et purifiée au laboratoire sous forme recombinante avec une étiquette polyhistidine non clivable, ce qui permet son élimination sur la colonne avec les produits non clivés.

### ***(b) Chromatographie par exclusion de taille***

A la suite de chromatographie d'affinité, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont regroupées et concentrées, puis déposées sur une colonne Superdex 200 ou Superdex 75 selon la poids moléculaire de la protéine préalablement équilibrée dans du tampon 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl. La chromatographie se fait sur un système Äkta Purifier à un débit de 1 ml/min, les fractions d'élution collectées sont analysées par SDS-PAGE. Les fractions pures contenant notre protéine sont regroupées et conservées à 4°C. La détermination de la concentration se fait par mesure d'absorbance à 280nm.

## **2) Constructions du domaine SH3**

Deux constructions de la protéine SH3<sub>1</sub> ont été utilisées. La première ne possède pas d'étiquette de purification, et nous avons vu plus tôt qu'elle est produite sous forme de corps d'inclusion. La deuxième construction possède une étiquette GST qui permettra de purifier la forme soluble par chromatographie d'affinité

### ***(a) SH3<sub>1</sub>***

#### **(i) Dénaturation des protéines**

##### ***• Lavage des corps d'inclusion***

Chaque lavage des corps d'inclusion est suivi d'une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes à 45000g. La fraction non soluble est ensuite resuspendue au Potter. Les corps d'inclusion sont lavés successivement dans des tampons contenant 20 mM Tris pH8, 2 M NaCl puis 20 mM Tris pH8, 2% Triton, puis 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl avant d'être

enfin repris et laissés à agiter sur la nuit à 4°C dans du tampon 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 8 M urée qui permet de dénaturer les protéines.

- *Purification de la protéine dénaturée*

Pour séparer les agrégats restants de la protéine dénaturée une chromatographie d'exclusion de taille est réalisée. Les corps d'inclusion solubilisés dans le tampon urée sont filtrés sur membrane de nitrocellulose 0,22 µm, puis injectés sur colonne Superdex 75, préalablement équilibrée dans un tampon contenant 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 6 M urée.

(ii) Renaturation des protéines par dialyse

La renaturation est faite par une méthode de dialyse. Les fractions contenant la protéine sont regroupées puis dialysées successivement contre un tampon ayant une concentration décroissante en urée (4 M, 2 M, 0 M). Le dernier tampon de dialyse est supplémenté avec 5% de glycérol pour augmenter la stabilité de la protéine et la conserver. Une dernière étape de chromatographie d'exclusion de taille dans du tampon 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 5% glycérol sur une colonne Superdex 75 permet de séparer les agrégats restants et de s'assurer de son repliement. En effet, le volume d'élution de la protéine est différent en urée ou en tampon tris. La chromatographie se fait sur un système Äkta Purifier à un débit de 1 ml/min, les fractions d'élution collectées sont analysées par SDS-PAGE. Celles contenant notre protéine sont regroupées et conservées à 4°C. La détermination de la concentration se fait par mesure d'absorbance à 280 nm.

**(b) *GST-SH3<sub>1</sub>***

La protéine GST-SH3<sub>1</sub> est exprimée en fusion avec une étiquette GST (Glutathion-S-Transférase) à l'extrémité N-terminale. La GST est une protéine très soluble qui peut, dans certains cas, augmenter la solubilité de la protéine avec laquelle elle est fusionnée lors de la surexpression. Cette étiquette favorise le repliement et permet aussi de faire une première étape de purification par chromatographie d'affinité sur une résine Glutathion. Les différentes formes oligomériques sont ensuite séparées par chromatographie d'exclusion de taille.

(i) Chromatographie d'affinité glutathion

La fraction soluble de l'extraction cellulaire est mélangée à une résine Glutathion superflow (Macherey-Nagel) puis mis à agiter à 4°C sur une roue tournante pendant 4 heures. Le mélange est ensuite déposé sur colonne, puis lavé avec un volume équivalent à 5 fois le

volume de la résine d'un tampon contenant 50 mM Tris pH8, 20 mM NaCl et 5 mM DTT. L'élution de la protéine se fait par le même tampon supplémenté avec 10 mM de glutathion réduit qui va entrer en compétition avec la résine glutathion.

### (ii) Chromatographie d'exclusion de taille

A la suite de la chromatographie d'affinité, la protéine éluée est concentrée puis injectée sur une colonne Superdex 75 préalablement équilibrée dans un tampon contenant 50 mM Tris pH8, 20 mM NaCl et 5 mM DTT. La chromatographie se fait sur un système Äkta Purifier à un débit de 1ml/min, les fractions d'élution collectées sont analysées par SDS-PAGE. Celles contenant notre protéine sont regroupées et conservées à 4°C. La détermination de la concentration se fait par mesure d'absorbance à 280 nm.

## **C . SDS-PAGE et Western Blot**

### ***1) SDS-PAGE***

La détermination de la composition d'échantillons protéique et de l'état de pureté des échantillons a été réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Les échantillons ont été traités par le sodium dodécyl sulfate (SDS) et le  $\beta$ -mercaptoéthanol puis chauffés à 98°C pour dénaturer et réduire les ponts disulfures de la protéine. Dans le cas du SDS-PAGE en conditions non réductrices, les échantillons n'ont pas été traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol, ni chauffés.

Après migration, la révélation des gels se fait par coloration des protéines au bleu de Coomassie.

### ***2) Western Blot***

Le transfert sur membrane permet de révéler des quantités de protéine beaucoup plus faibles que par coloration des SDS-PAGE au bleu de Coomassie grâce à une immunodétection de la protéine cible.

Après migration sur SDS-PAGE, les protéines sont électrotransférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene Di-Fuoride ; Millipore), préalablement immergée dans du méthanol et un tampon contenant 25 mM Tris pH8, 0,01% SDS et 200 mM glycine. Le transfert est réalisé à 4°C pendant 1 heure à 45 mA par gel à l'aide d'un appareil de transfert

(ECL semy dry, Amersham/GE Healthcare) dans un tampon Tris/Glycine (25 mM Tris, 0,01% SDS et 200 mM glycine). A la fin du transfert, la membrane est immergée dans une solution de saturation contenant 5% w/v de lait écrémé en poudre dans du TNT (100 mM Tris pH7,5 , 150 mM NaCl, 0,05% Tween20) durant 1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite rincée avec du TNT pendant 5 minutes à 3 reprises avant d'être incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps anti-polyhistidine monoclonal couplé à la peroxydase de raifort (HRP ; Sigma) dilué dans le TNT. Après 3 lavages au TNT, la révélation de l'activité peroxydase s'effectue grâce à du 3-3' diaminobenzidine (pastilles SIGMAFAST).

## D . Biotinylation des protéines

Les protéines SH3<sub>1</sub>-BirA, ElmoWT-BirA, ElmoΔC-BirA, ElmoPH-BirA et ElmoΔN-BirA sont produites avec une étiquette de biotinylation (Tableau II). La biotinylation de ces étiquettes est réalisée par la Biotin ligase (Avidity) pendant 30 minutes à 30°C dans les conditions décrites dans le Tableau XXII. Après concentration, une chromatographie d'exclusion est effectuée pour séparer la protéine biotinylée d'intérêt de la biotine et de possibles agrégats.

Solution	Quantité
Protéine	1 ml à 40 μM
Biomix A	125 μl
Biomix B	125 μl
BirA	5,3 μl

**Tableau XXII : Composition du milieu réactionnel de biotinylation par BirA.**

**Biomix A:** 0,5 M tampon bicine pH8,3. **Biomix B:** 100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 500 μM d-biotin. **BirA :** enzyme Biotin ligase.

Afin de vérifier l'efficacité de la biotinylation, un test a été mis en place avec l'aide de Philippe Mas (EMBL-Grenoble). Après analyse par SDS-PAGE et transfert sur membrane de PVDF la biotinylation de la protéine est révélée par fluorescence.

La membrane est lavée trois fois dans du PBS-Tween 0,1 % avant d'être incubée pendant 1 heure dans une solution de saturation (Superblock, ThermoScientific). Après plusieurs rinçages dans du PBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée dans 50 ml d'une solution de PBS Tween 0,1 % supplémentée par 10 μl de Streptavidin-Alexa-488

(streptavidine couplée au marqueur fluorescent Alexa dont la longueur d'excitation est 488nm). A partir de cette étape, la membrane doit rester dans l'obscurité totale. La membrane est ensuite rincée dans du PBS-Tween 0,1%, et séchée dans du papier buvard. La révélation se fait par révélation lumineuse à une longueur d'onde de 488 nm.

### III . Méthodes de caractérisation des protéines

Une fois les échantillons de protéines produits et purifiés, il est important de les contrôler et de les caractériser pour débiter toute étude d'interaction ou de structure. De nombreuses méthodes biochimiques et biophysiques permettent d'analyser les solutions protéiques, nous allons décrire ici celles que nous avons utilisées lors de l'étude des protéines Elmo et Dock.

#### A . Spectroscopie d'absorbance

La concentration des échantillons protéiques purifiés est déterminée par mesure d'absorbance selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon C l$$

où A est l'absorbance,  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire en  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , C est la concentration en  $\text{mol.l}^{-1}$  et l est la longueur du trajet optique, dans notre cas  $l = 1\text{cm}$ .

Le coefficient d'extinction molaire théorique  $\epsilon$  est calculé selon la formule d'Edelhoc (Edelhoc 1967) mais les coefficients utilisés pour les acides aminés pris en compte sont ceux déterminés par Pace (Pace, Vajdos et al. 1995) ce qui donne la formule suivante :

$$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{l.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}) = 5500 \times (\text{N Trp}) + 1490 \times (\text{N Tyr}) + 125 \times (\text{N Cys})$$

où (N Trp), (N Tyr) et (N Cys) correspondent respectivement au nombre de tryptophanes, de tyrosines et de cystéines présents dans la protéine.

La concentration d'une protéine peut être déterminée directement à partir de l'absorbance à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction spécifique  $E_{(0,1\%)}$  calculé selon la formule suivante :

$$E_{(0,1\%)} = \epsilon_{280\text{nm}} / M$$

où M est la masse molaire de la protéine. Les coefficients d'extinction spécifique et les masses molaires des protéines étudiées sont rassemblés dans le Tableau II.

## B . Séquençage N-terminal des protéines

La détermination de la séquence N-terminale des protéines a été réalisée par Jean-Pierre Andrieu sur la plateforme de séquençage du PSB à l'IBS. Le séquençage est basé sur la dégradation d'Edman qui permet de générer à chaque cycle de dégradation un dérivé stable spécifique de l'acide aminé en position N-terminale, le phénylthiohydantoïne-acide aminé qui sera séparé, quantifié et identifié par chromatographie.

Le séquençage N-terminal a été utilisé pour vérifier le clivage de l'étiquette hexahistidine en N-terminal de la séquence de Elmo par la protéase TEV.

## C . Spectrométrie de masse

Les analyses de masse ont été réalisées sur la plateforme de spectrométrie de masse du PSB à l'IBS en utilisant les techniques d'ionisation de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) ou d'électrospray (ESI) couplées à un analyseur de temps de vol (TOF).

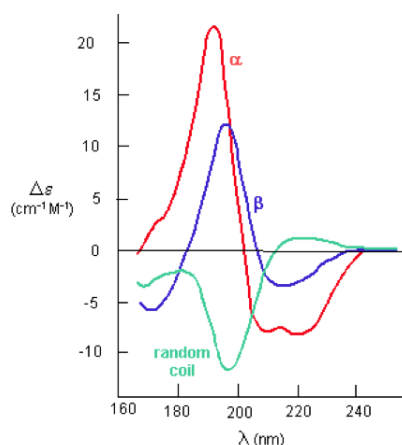
L'analyse par spectrométrie de masse a été utilisée pour vérifier la masse des nouvelles constructions de protéine, pour vérifier le clivage de l'étiquette hexahistidine en N-terminal de Elmo par la protéase TEV, déterminer la masse de fragments de Elmo produits par la protéolyse par la subtilysine et l'élastase et enfin pour déterminer le nombre de résidus de lysines méthylés chimiquement en vue d'améliorer la cristallisation de la protéine Elmo.

## D . Dichroïsme circulaire

Les analyses de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur la plateforme de biophysique du PSB à l'UVHCI à l'aide d'un spectropolarimètre JASCO J-810. Cette méthode se base sur l'interaction entre une lumière circulairement polarisée et des molécules asymétriques (retrouvées généralement dans des échantillons biologiques). La structure secondaire des protéines et en particulier les structures en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  présentent des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques. La répartition spectrale du dichroïsme circulaire dans le domaine des ultraviolets donne des informations sur la structure secondaire des protéines (Figure 31). Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à 25°C à l'aide d'une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique entre 200 nm et 260 nm et ramenés en unité d'ellipsité molaire par résidu (unité :  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ) selon la formule suivante :  $[\theta]_{\text{MRW}} = \theta_d / (c * l * n)$  avec  $n$  le nombre de résidus de la protéine,  $l$  la largeur de la cuvette et

c la concentration de l'échantillon.  $\theta$  est exprimé en millidegrés.

Le dichroïsme circulaire a été utilisé pour vérifier l'état du repliement de nouvelles constructions de Elmo en observant la présence d'une structuration tridimensionnelle. La correction du signal est faite à partir d'un spectre du tampon dans les mêmes conditions.



**Figure 31 : Spectre caractéristique de dichroïsme circulaire (CD).**

L'absorption caractéristique des feuillets  $\beta$  est représentée en bleue avec un minimum entre 210 et 212 nm, les hélices  $\alpha$  possèdent une absorption caractéristique représentée en rouge avec deux minima à 208 et 222 nm et les entités non structurées (random coil) possèdent une absorption représentée en vert.

## E . SEC-MALLS

La diffusion de lumière multi-angles couplée à la chromatographie d'exclusion de taille et à la réfractométrie (SEC-MALLS) permet de déterminer la masse molaire et le rayon hydrodynamique de macromolécules. Cette technologie a été utilisée grâce à la plateforme de biophysique du PSB à l'UVHCI. La chromatographie d'exclusion de taille est réalisée à l'aide d'une HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) avec une colonne de filtration sur gel Superdex 200 (GE Healthcare) ayant un domaine de fractionnement de 10 kDa à 600 kDa à un débit de 1ml/min dans le tampon de purification de la protéine. La diffusion de lumière statique est mesurée à 18 angles différents simultanément à l'aide d'un détecteur DAWN-EOS (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) en utilisant un laser qui émet à 690 nm, l'excès d'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre différentiel RI2000b (Schambeck). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel ASTRA V (Wyatt Technology Corp.).

Le SEC-MALLS a été utilisé pour analyser l'état d'oligomérisation de la protéine ElmoWT, ainsi que pour caractériser le complexe formé par différents fragments de Elmo1 avec SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .



## F . Pontage chimique

Le pontage chimique permet de créer un pontage covalent entre deux molécules grâce à un agent chimique. Le pontage va permettre de fixer de manière covalente deux molécules qui se trouvent déjà à proximité l'une de l'autre, c'est à dire des molécules qui sont potentiellement en interaction. Cette technique est souvent utilisée pour stabiliser des états d'oligomérisations ou des complexes protéiques afin de mieux les étudier. Nous avons ici utilisé l'ethyl glycol succinamide (EGS) et le glutaraldéhyde, qui sont des molécules qui ont la propriété de ponter les amines libres des acides aminés (lysines) distants d'environ 16Å.

L'état d'oligomérisation de Elmo et des fragments ElmoPH et ElmoΔN a été analysé par pontage chimique dans un tampon contenant 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl. La protéine a été incubée à température ambiante avec des concentrations d'EGS ou de glutaraldéhyde allant de 0,5 mM à 10 mM. La réaction est stoppée après 30 minutes par ajout de 140 mM Tris-HCl. La taille des molécules pontées est ensuite analysée par SDS-PAGE.

## IV . Méthodes de caractérisation des interactions protéiques

L'étude des protéines Elmo et Dock implique une analyse approfondie des interactions qui lient ces deux partenaires. Nous avons essayé de mettre en évidence les régions d'interaction et le rôle de chacune. Pour cela nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires comme la résonance plasmonique de surface et la résonance magnétique nucléaire. Nous allons détailler ici toutes les méthodes d'étude utilisées.

### A . Co-précipitation

L'interaction entre la protéine GST-SH3<sub>1</sub> et le fragment ElmoΔN a été testée par co-précipitation. Le surnageant de la lyse cellulaire de bactéries transformées par le vecteur pGEX-TEV contenant la séquence de GST-SH3<sub>1</sub> est fixé à une résine Glutathion uniflow (Macherey-Nagel), après plusieurs lavages avec un tampon contenant 20 mM Tris pH8, 20 mM NaCl, 100 µg de protéine ElmoΔN sont déposés incubés 1 heure à 4°C sur la résine. Après plusieurs lavages, l'élution se fait par ajout de bleu de charge Laemmli. Les fractions des différentes étapes sont analysées par SDS-PAGE. Deux expériences témoin sont réalisées, dans la première, ElmoΔN n'est pas injecté sur la résine, la protéine GST-SH3<sub>1</sub> est donc éluée seule. Dans la deuxième, une quantité équivalente de ElmoΔN est déposée sur une résine seule sans GST-SH3<sub>1</sub>.

### B . Microcalorimétrie isotherme de titration

#### *1) Principe*

La microcalorimétrie isotherme de titration (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) permet de caractériser les interactions entre deux composés en solution en mesurant le dégagement ou l'absorption de chaleur au cours de l'interaction. L'ITC prend en compte tous les processus intervenant dans la solution comme la formation et la destruction des liaisons hydrogènes, les changements de conformation ou encore la désolvatation. Elle est particulièrement adaptée à l'étude des protéines, car elle ne nécessite pas de marquage préalable ou d'immobilisation de la protéine sur une surface. Elle permet en une expérience

d'obtenir des données thermodynamiques comme la contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) et entropique de la réaction ( $\Delta S$ ), la constante d'affinité ( $K_a$ ) et la stoechiométrie de la réaction ( $n$ ). L'ITC permet de mesurer une gamme d'affinité allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$  M.

## ***2) Mode opératoire***

Les expériences d'ITC sont réalisées sur la plateforme de biophysique du PSB à l'UVHCI sur un calorimètre de type VP-ITC (Microcal LLC) à 25°C sous agitation et pour un volume de cellule de 1,5 ml. Dans un premier temps, la protéine ElmoWT est déposée dans la cellule à 32,5  $\mu\text{M}$  et la protéine SH3<sub>1</sub> est placée dans la seringue d'injection à 292,1  $\mu\text{M}$ . Des injections successives de 2  $\mu\text{l}$  en 4 s sont effectuées toutes les 240 s. Puis la protéine SH3 est déposée dans la cellule à 4  $\mu\text{M}$  avec la protéine ElmoWT dans la seringue à 65  $\mu\text{M}$ . Des expériences témoin sont réalisées en injectant l'une ou l'autre des protéines dans une cellule ne contenant que du tampon de la protéine. Les courbes représentant la variation de chaleur sont analysées avec le logiciel Origin.

# **C . Résonance Plasmonique de Surface (SPR)**

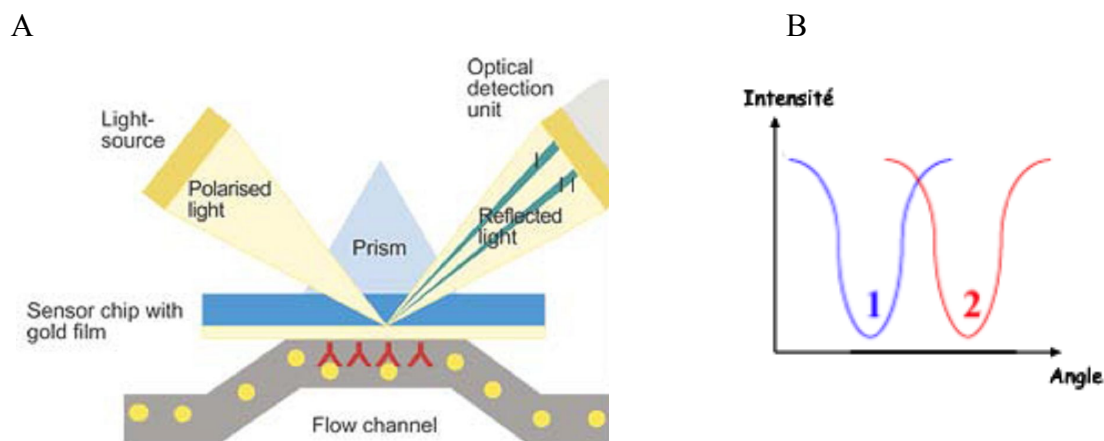
## ***1) Principe***

La technologie de résonance plasmonique de surface (SPR : Surface Plasmon Resonance) permet d'étudier en temps réel des interactions moléculaires sans aucun marquage de molécules. L'intérêt majeur est de pouvoir visualiser l'interaction et calculer les paramètres cinétiques en mesurant les constantes d'association et de dissociation. Le principe général est d'enregistrer en continu, à la surface d'une puce, appelée sensor-chip, la modification de résonance induite par toute interaction moléculaire. Cette modification est directement proportionnelle à la masse des molécules injectées sur la puce.

La sensor-chip est une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or de 50 nm d'épaisseur, riche en électrons libres, elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur laquelle est couplée la première molécule (le ligand ou la molécule de couplage secondaire) impliquée dans la réaction à étudier. L'autre partenaire (l'analyte) de l'interaction est injecté dans un flux continu de tampon par un système microfluidique à la surface de la puce.

Une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre en contact avec la lamelle. La lumière subit une réflexion totale interne. Les photons du faisceau de l'onde évanescente résultante entrent en résonance avec les nuages électroniques des atomes d'or (ou plasmons)

(Figure 32). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité, à un angle défini (l'angle de résonance). Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu dans lequel se diffuse l'onde évanescente, c'est-à-dire qu'il sera d'autant plus important que la quantité de protéines fixées sera forte. Le signal est exprimé en unité arbitraire (RU). Pour une puce CM5, 1000 RU correspondant à un déplacement de l'angle de  $0,1^\circ$  et équivalent à la fixation de 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$  de surface.



**Figure 32 : Schéma de principe du système Biacore.**

**A : Principe du système de Résonance Plasmonique de Surface. B : Variation d'intensité dans le faisceau de lumière réfléchi en fonction de l'angle.**

L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance en fonction du temps s'appelle un sensorgramme : il permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur la sensor-chip (Figure 33). Il est composé d'une phase d'injection (association), d'une phase de post-injection (dissociation) dans un flux de tampon seul et d'une phase de régénération. Le sensorgramme permet de déterminer les constantes cinétiques d'association ( $k_{on}$ ), de dissociation ( $k_{off}$ ), et la constante d'affinité ( $K_D$ ). La concentration en molécules fonctionnelles, la stœchiométrie, la cartographie des sites d'interaction ainsi que certains paramètres thermodynamiques peuvent également être déterminés par cette technologie. Elle permet la caractérisation des interactions moléculaires impliquant les petites molécules et toutes les classes de macromolécules biologiques (protéines, polysaccharides, lipides et acides nucléiques). Elle s'applique à l'étude d'analytes purifiés mais aussi à celle d'analytes présents dans des milieux complexes (lysats cellulaires ou bactériens, extraits tissulaires, sérums et autres liquides biologiques).

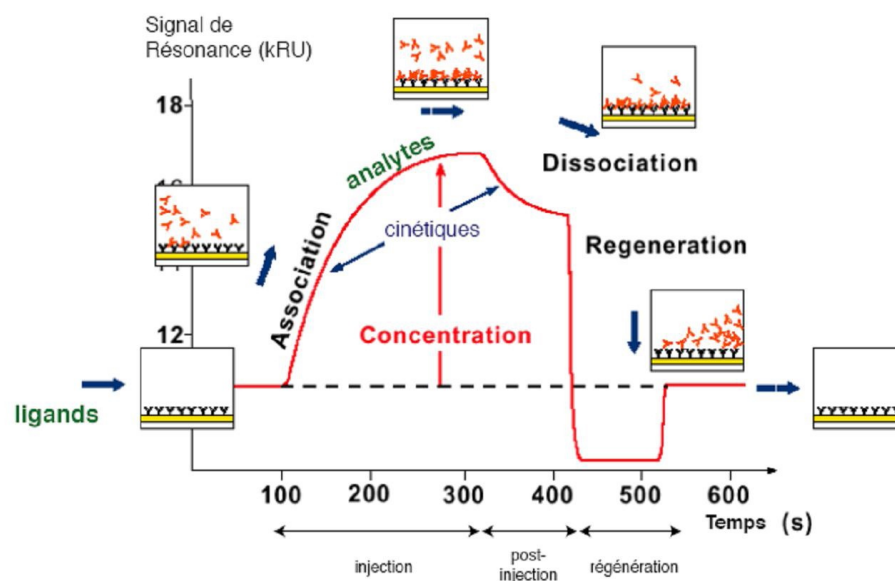


Figure 33 : Sensorgramme.

Le sensorgramme permet de suivre en temps réel la fixation des molécules sur la puce. Il est composé d'une phase d'association, d'une phase de dissociation et d'une phase de régénération.

## 2) *Fonctionnalisation des surfaces*

Toutes les expériences de SPR ont été réalisées sur un instrument Biacore 3000 (GE Healthcare) à l'IBS sur la plateforme du PSB. Les échantillons de protéines ont été purifiés comme décrit en page 102. Différentes stratégies d'immobilisation ont été mises en place pour améliorer les données d'interaction obtenues. Le tampon de course (25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl 0,005% P20) a été utilisé pour toutes les expériences.

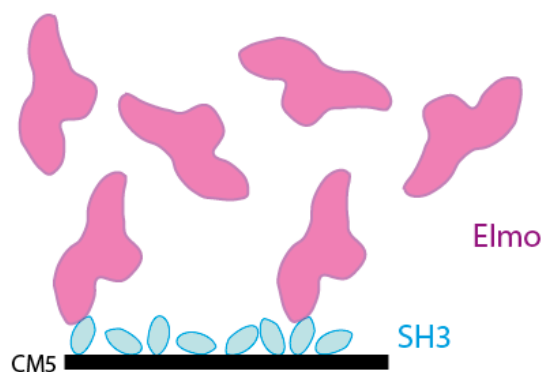
### (a) *Couplage direct du ligand par son amine primaire*

Les puces utilisées sont des sensor-chips CM5 (GE Healthcare). Elles sont constituées de quatre canaux indépendants contenant chacun une matrice de dextran carboxyméthylé.

Les groupements carboxyles sont activés, sous la forme d'esters de succinimide par injection de 35  $\mu$ l d'un mélange de 0,2 M 1-éthyl-N'-(diéthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et 0,05 M N-hydroxy-succinimide (NHS) à 5  $\mu$ l/min. Le ligand, qui doit être chargé positivement pour interagir avec la puce, est dilué à 20  $\mu$ g/ml dans un tampon acétate de sodium 10 mM pH4,5 et immobilisé par réaction entre ses amines primaires et les groupements actifs sur les pistes 2, 3 et 4 à un niveau compris entre 500 RU (unité arbitraire) et 4000 RU. Les groupements esters restés libres sur les 4 pistes sont saturés par 35  $\mu$ l d'une solution d'éthanolamine 1 M. La piste 1 fonctionnalisée de la même façon mais sans ligand

constitue une surface de contrôle négatif.

Cette technique offre l'avantage d'être facilement réalisable sans avoir besoin de modifier les protéines d'intérêt. Cependant, elle nécessite la dilution du ligand dans un tampon à faible pH. Des essais préliminaires, réalisés au laboratoire par Jean-Baptiste Reiser avant mon arrivée en thèse, ont montrés que les puces ne pouvaient pas être fonctionnalisées avec la protéine ElmoWT dans ces conditions. Nous avons donc immobilisé la protéine SH3<sub>1</sub> et utilisé les différents fragments de la protéine Elmo1 comme analytes (ElmoWT, ElmoΔPxxP, ElmoΔC, ElmoN, ElmoΔN, ElmoPH) (Figure 34). Par cette méthode, le ligand est immobilisé de manière aléatoire à la surface, les sites d'interaction avec l'analyte ne sont donc pas forcément tous disponibles, et cela pourrait entraîner des difficultés lors de l'analyse des données expérimentales. En effet, si le site d'interaction n'est pas complètement disponible cela peut entraîner des cinétiques d'association et de dissociations différentes. Pour les éviter nous avons donc aussi utilisé des techniques de couplage secondaire qui permettent d'orienter la fixation des protéines sur la surface.



**Figure 34 : Couplage direct du ligand par son amine primaire.**

La protéine SH3<sub>1</sub> (le ligand) est immobilisée de manière covalente par couplage amine à la matrice de la puce CM5. La protéine Elmo (l'analyte) est injectée dans un flux continu de tampon à sa surface.

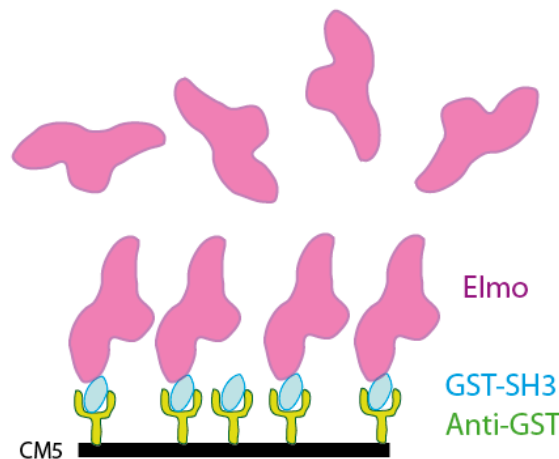
### ***(b) Couplage secondaire du ligand***

#### ***(i) Capture par un anticorps anti-GST***

Cette technique a été réalisée à l'aide du kit GST Capture Kit (GE Healthcare). Une solution d'anticorps anti-GST est préparée à 30 µg/ml dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH5. Les anticorps anti-GST sont au préalable immobilisés sur la puce par couplage amine comme décrit précédemment. Ils sont immobilisés sur les 4 pistes à un niveau d'environ 10000 RU. Le ligand, une protéine de fusion GST, dilué à 5µg/ml dans du tampon de course est ensuite injecté à 20 µl/min jusqu'à atteindre un niveau de capture compris entre

1000 RU et 2000 RU sur les pistes 2,3 et 4.

Cette technique a été utilisée pour analyser l'interaction entre la protéine de fusion GST-SH3<sub>1</sub> et différents fragments de la protéine Elmo1 (ElmoWT et ElmoΔC) (Figure 35).



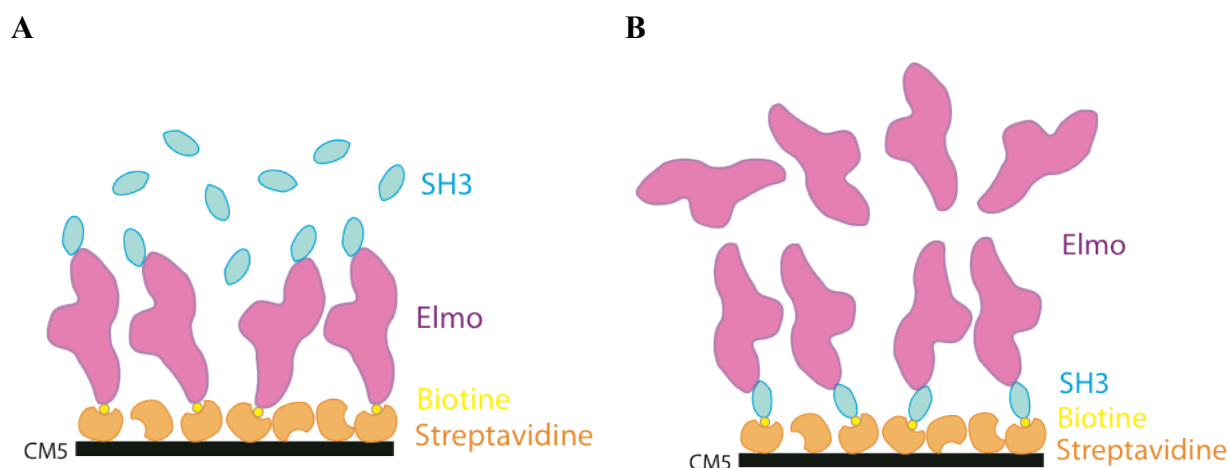
**Figure 35 : Capture du ligand par un anticorps anti-GST.**

Un anticorps anti-GST est immobilisé de manière covalente par couplage amine à la matrice de la puce CM5. Le ligand possédant une étiquette GST, la protéine GST-SH3<sub>1</sub>, est capturé par cet anticorps. La protéine Elmo (l'analyte) est injectée dans un flux continu de tampon à sa surface.

### (ii) Capture par la streptavidine

Une solution de streptavidine à 20 µg/ml dans du tampon acétate de sodium 10mM pH5 est préparée et immobilisée sur la puce par couplage amine comme décrit précédemment. Elle est immobilisée sur les pistes 2, 3 et 4 à un niveau compris entre 1000 RU et 2000 RU. Le ligand, ici une protéine biotinylée, diluée à 20 µg/ml dans du tampon de course est ensuite injecté à 5 µl/min jusqu'à atteindre un niveau de capture compris entre 500 RU et 4000 RU sur les pistes 2,3 et 4.

Cette technique a été utilisée pour analyser l'interaction entre la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA utilisée comme ligand et les fragments de la protéine Elmo1 (ElmoΔN, ElmoPH, ElmoWT, ElmoΔC, ElmoΔPxxP et ElmoN) mais aussi avec les protéines ElmoΔN-BirA, ElmoWT-BirA et ElmoΔC-BirA utilisées comme ligand avec la protéine SH3<sub>1</sub> comme analyte (Figure 36).



**Figure 36 : Capture du ligand par la streptavidine.**

**A :** La streptavidine fixée par couplage amine sur la puce CM5 capture la biotine de l'étiquette de biotinylation de la protéine ElmoBirA. La protéine SH3<sub>1</sub> est injectée dans un flux continu de tampon. **B :** La streptavidine fixée par couplage amine sur la puce CM5 capture la biotine de l'étiquette de biotinylation de la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA. La protéine Elmo est injectée dans un flux continu de tampon.

### (iii) Couplage sur une puce NTA

Les biocapteurs utilisés sont des sensor-chips NTA (GE Healthcare) dont les surfaces ont été régénérées au préalable par 5 µl de solution de régénération 1 (25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl, 350 mM EDTA, 0,005% P20) pour les traces éventuelles de Nickel ou de ligand puis activées par 25 µl de NiCl<sub>2</sub> 500 µM. Le ligand, la protéine ElmoΔN, diluée à 50 nM dans du tampon de course, est immobilisée à 5 µl/min sur les pistes 2, 3 et 4 grâce à l'interaction de son étiquette hexahistidine avec le NiNTA. Les pistes peuvent être régénérées avec du tampon de régénération 2 (25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl, 0,5 M Imidazole, 0,005% P20) qui permet par compétition d'éliminer le ligand tout en gardant intact le Nickel.

Cette technique a été utilisée pour essayer d'étudier l'interaction entre la protéine ElmoΔN et la protéine SH3<sub>1</sub>. Toutefois, l'interaction de l'étiquette hexahistidine du ligand avec la surface n'est pas assez « forte ». En effet, une diminution de la quantité de ligand fixé, de plus de 10%, est observée en 20 minutes, ce qui n'est pas compatible avec des mesures de cinétique. D'après (Nieba, Nieba-Axmann et al. 1997) il est préférable que le ligand possède deux étiquettes hexahistidine ou une étiquette décahistidine. Pour cela, nous avons essayé de modifier l'étiquette polyhistidine du ligand pour créer une étiquette décahistidine mais nos stratégies de modifications n'ont pas abouti (en page 90).





Figure 37 : Couplage du ligand sur une puce NTA.

La protéine Elmo (le ligand) est immobilisée à la matrice de la puce NTA chargée en  $\text{NiCl}_2$  par son interaction avec l'étiquette poly-histidine. La protéine SH3<sub>1</sub> (l'analyte) est injectée dans un flux continu de tampon à sa surface.

### 3) *Tests d'interaction*

Les expériences ont été réalisées à un débit de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  à 25°C. Les échantillons « analytes » sont dilués en cascade avec un facteur 2 dans du tampon de course puis injectés simultanément sur les différentes pistes. La phase d'association se fait pendant l'injection de 100  $\mu\text{l}$  d'analyte. La dissociation est réalisée pendant 200 s, mais sans retour au signal de base, indiquant que les complexes ne sont pas tous dissociés. Plusieurs solutions de régénération ont été testées mais seule une solution de 10 mM glycine pH 2 dans du tampon de course a eu un effet positif mais insuffisant pour dissocier tous les complexes formés. La régénération est une étape sensible car il faut réussir à dissocier le complexe ligand/analyte sans dénaturer le ligand.

Pour pallier ce problème nous avons utilisé la méthode de cinétique en un seul cycle (single cycle kinetic titration) décrite en 2006 par Karlsson (Karlsson, Katsamba et al. 2006). Cette méthode consiste à injecter de manière successive des concentrations croissantes d'analyte sans processus de régénération. Cinq concentrations d'analyte sont injectées à un débit de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  en utilisant un temps de contact de 200 s et un temps de dissociation de 400 s. Avant chaque cycle d'interaction protéique, du tampon de course est aussi injecté de la même manière pour être utilisé comme double référence.

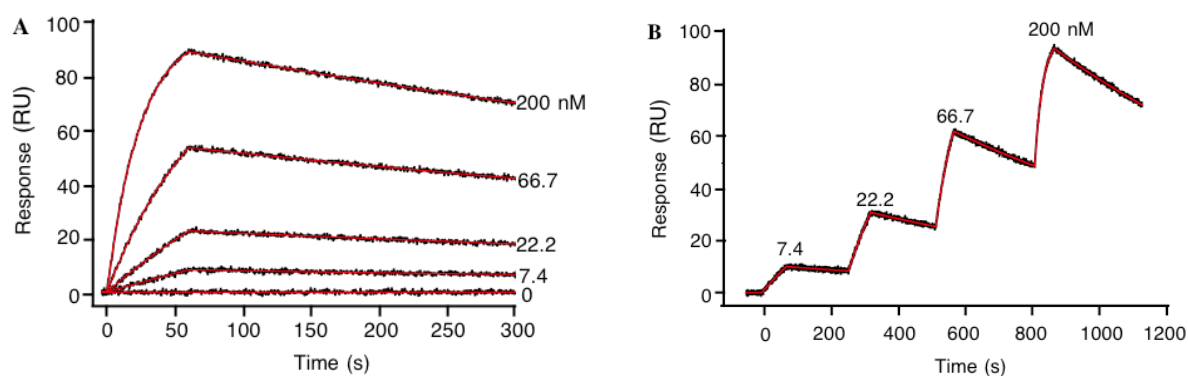


Figure 38 : Comparaison de la cinétique classique et de la cinétique en un seul cycle.

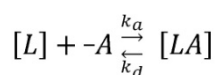
Courbes noires : données simulées. Courbes rouges : ajustement des données avec le modèle d'interaction 1 :1. A : Données simulées pour une expérience de cinétique classique. B : Données simulées pour une cinétique en un seul cycle. D'après (Karlsson, Katsamba et al. 2006)

#### 4) *Traitement des données*

Les sensorgrammes ont ensuite été analysés avec le logiciel BIAevaluation 3.1. Pour chaque expérience, la courbe d'interaction de l'analyte sur la piste de référence et si nécessaire celle du tampon sur le ligand ont été soustraites à la courbe d'interaction de l'analyte sur le ligand. Les paramètres cinétiques ( $k_a$  et  $k_d$ ) ont initialement été analysés d'après un modèle de Langmuir 1:1 en utilisant le logiciel BIAevaluation3.1. Ce modèle se base sur la loi d'action de masse et représente la réaction la plus simple entre deux protéines.

On suppose que la réaction entre le ligand immobilisé (L) et l'analyte suit une cinétique de pseudo-premier ordre, c'est-à-dire que la concentration en analyte est supposée très supérieure à celle du ligand. Cette concentration sera alors considérée comme constante durant la réaction. Durant la phase d'association le complexe ligand-analyte (LA) augmente en fonction du temps. L'équation différentielle de vitesse représentée ci-dessous décrit la relation entre les différents paramètres de la réaction.

Loi d'action de masse :



A l'équilibre :

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[L][A]}{[LA]}$$

Equation de la vitesse de formation du complexe :

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot [A] - k_d \cdot [LA]$$

*[L]* est la concentration du ligand

*[A]* est la concentration de l'analyte

*[LA]* est la concentration du complexe ligand-analyte

*k<sub>a</sub>* est la constante d'association qui décrit la vitesse de formation du complexe

*k<sub>d</sub>* est la vitesse de dissociation qui décrit la stabilité du complexe

Une valeur statistique permet de mesurer la concordance entre la courbe expérimentale et la courbe affinée, c'est le Chi<sup>2</sup> (formule ci-dessous), sa valeur doit être de l'ordre de grandeur du niveau du bruit dans le sensorgramme.

$$Chi^2 = \frac{\sum (R_f - R_x)^2}{n - p}$$

*R<sub>f</sub>* est la réponse de la courbe du modèle

*R<sub>x</sub>* est la réponse de la courbe expérimentale

*n* est le nombre de mesures effectuées

*p* est le nombre de paramètres dans le modèle

Dans certains cas, les courbes affinées correspondant au modèle 1:1 ne se superposaient pas parfaitement aux courbes expérimentales. Le programme Biaevaluation lié au Biacore 3000 sur lequel les expériences ont été effectuées ne permet pas d'utiliser d'autres modèles d'ajustement que le modèle de Langmuir 1:1 avec une cinétique de titration en un seul cycle. Bien que d'autres modèles d'ajustements soient disponibles sur les versions du programme Biaevaluation liées aux Biacore T100 ou T200, il n'est pas possible d'importer nos données dans ces programmes pour les analyser. Nous avons donc aussi utilisé un autre programme d'ajustement, le logiciel libre Fityk (Wojdyr 2010) pour analyser les données. Dominique Housset a écrit des scripts pour ce programme permettant de calculer des ajustements pour des courbes de cinétique selon la méthode de titration cinétique en un seul cycle. Les expressions analytiques de la fonction réponse pour le modèle d'interaction 1:1 de Langmuir équivalent à celui du programme Biaevaluation et pour un modèle d'interaction à ligand hétérogène ont pu être introduites dans ces scripts.

## D . Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est une technique efficace pour localiser les sites d'interaction d'une protéine avec son partenaire. Elle se base sur l'analyse de spectre  $^{15}\text{N}$ -HSQC. Dans ce spectre, il est possible d'observer les « connections » entre les protons amide et les atomes d'azotes. Il est nécessaire d'avoir une protéine marquée à l'isotope  $^{15}\text{N}$  pour ces expériences de RMN. Chaque résidu est composé d'au moins un NH, celui de la chaîne principale. Dans un spectre HSQC, chaque pic correspond à un groupement NH, donc à un acide aminé. Le déplacement chimique du NH est sensible à l'environnement chimique des deux atomes.

Lors d'une interaction avec un partenaire non marqué, les pics montrent un changement des déplacements chimiques dans le spectre HSQC du complexe comparé à celui de la protéine marquée seule. Ces modifications peuvent être dues à deux phénomènes. Les déplacements chimiques des résidus à l'interface peuvent être perturbés par la proximité de ce partenaire. Mais aussi, l'addition de ce partenaire peut induire des changements structuraux ou conformationnels dans la protéine marquée elle-même.

L'analyse de ces déplacements et leur attribution dans la structure de la protéine donnent des informations sur l'interface d'interaction et les changements structuraux de la protéine.

Les expériences de RMN ont été réalisées en collaboration avec Pierre Gans du groupe RMN à l'IBS. Les fragments ElmoWT et Elmo $\Delta\text{N}$  ont été produits au laboratoire. Les protéines marquées ainsi que de nouveaux fragments de Elmo1 contenant le motif PxxP (Elmo702-716 et Elmo700-727) ont été produits par Pierre Gans (Sevajol, Reiser et al. 2012) qui a aussi réalisé les enregistrements RMN et traité les données. La protéine SH3<sub>1</sub>, marquée au  $^{15}\text{N}$ , a été produite par surexpression dans des bactéries *E. coli* cultivées dans du milieu minimum M9, puis purifiée comme décrit précédemment en page 103 grâce à la plateforme de marquage isotopique de l'IBS (Sevajol, Reiser et al. 2012).

Les spectres  $^{15}\text{N}$ -HSQC ont été enregistrés avec un échantillon de la protéine SH3<sub>1</sub> marquée à une concentration de 80  $\mu\text{M}$  auquel nous avons ajouté une solution concentrée de protéine ElmoWT ou Elmo $\Delta\text{N}$  (typiquement 800  $\mu\text{M}$ ) pour parvenir à un ratio molaire final de 1:1. Les spectres RMN ont été enregistrés à 25°C sur un spectromètre Varian Inova 800 MHz. Toutes les expériences RMN ont été acquises en utilisant des séquences d'impulsion standard fournies dans le « Varian Protein Pack » (disponible sur [www.varianinc.com](http://www.varianinc.com)) avec une durée expérimentale comprise entre 42 et 44 min. Les données ont été traitées et analysées grâce à la suite logicielle nmrPipe/nmrDraw.

## V . Méthodes de détermination de structures des protéines

Dans le but d'améliorer les connaissances actuelles sur les protéines Elmo et Dock et notamment les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu lors de la formation du complexe, nous avons mené une étude structurale de ces protéines. Une première approche par cristallographie aux rayons X a été effectuée pour obtenir des données à haute résolution de la protéine Elmo1 et du complexe Elmo1/SH3<sub>1</sub>. Une deuxième technique a ensuite été mise en place afin d'obtenir des informations à basse résolution sur ces protéines, la diffusion des rayons X aux petits angles.

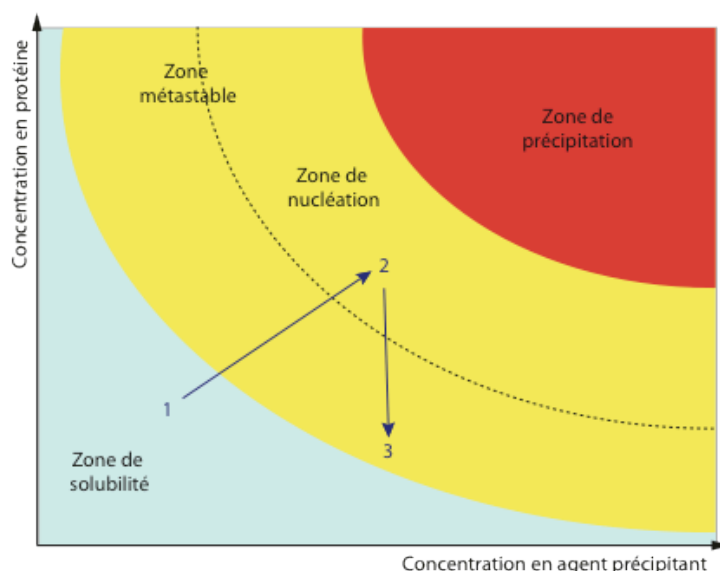
### A . Cristallographie aux rayons X des protéines

Pour observer un objet de petite taille nous utilisons habituellement un microscope. Cependant, cette technique n'est pas assez puissante pour observer une protéine car la longueur d'onde de la lumière entre 400 et 700 nm est plus grande que l'objet étudié, typiquement 2 à 15 nm. Il est donc nécessaire d'utiliser un rayonnement dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur du plus petit objet que l'on souhaite observer, en l'occurrence, les atomes constituant la protéine. Les distances interatomiques dans une protéine étant de l'ordre de l'Angström ( $10^{-10}$  m), les rayons X, ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de l'Angström, sont donc propices à leur étude. Malheureusement, l'interaction entre les rayons X et une molécule unique de protéine génère un signal de diffusion trop faible pour être mesuré. Il est donc nécessaire de l'amplifier en utilisant un cristal de protéines, dans lequel les molécules sont empilées de manière ordonnée. Cela permet aux ondes diffractées d'être cohérentes et de s'additionner afin d'avoir une intensité suffisamment forte pour être observée.

#### *1) Cristallogenèse*

La cristallogenèse consiste à rechercher les conditions optimales dans lesquelles les protéines vont s'organiser dans l'espace sous forme de cristal. Elles passent alors d'un état liquide désordonné à un état solide ordonné. Ceci se fait en deux étapes : la nucléation puis la croissance cristalline. Lors de la cristallisation, la concentration de la solution protéique augmente, par un procédé d'évaporation contrôlée, jusqu'à atteindre l'état de sur-saturation

favorable à la formation de cristaux (Figure 39). Cependant, les protéines représentent des structures biologiques fragiles dont la stabilité dépend de l'environnement dans lequel elles se trouvent (solvant, pH, concentration...), et le passage progressif d'un état soluble à un état solide ordonné peut rapidement basculer en une précipitation vers un état agrégé.



**Figure 39 : Diagramme de phase du processus de cristallogénèse.**

La flèche indique l'évolution des concentrations lors d'une expérience de cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur. L'évaporation de la goutte va permettre à la protéine de passer de la position 1 à la position 2. Après nucléation, la croissance cristalline permet un retour à l'équilibre thermodynamique en position 3.

La méthode utilisée au laboratoire pour la cristallogénèse est la diffusion de vapeur par goutte suspendue (Figure 40). Un puits est rempli de 500  $\mu\text{l}$  de solution de réservoir contenant les agents précipitants et les additifs. Une goutte de 2  $\mu\text{l}$  contenant un même volume de protéine purifiée et de solution du réservoir est déposée sur une lamelle siliconée qui va être placée et scellée tête en bas au-dessus du puits. L'équilibre des concentrations s'établit entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles entraînant ainsi une diminution du volume de la goutte. En résulte donc une augmentation de la concentration de la protéine et de l'agent précipitant dans la goutte jusqu'à atteindre l'état de sur-saturation, favorisant la formation de points de nucléation (Figure 39). Le retour à un état d'équilibre thermodynamique se fait dans le meilleur des cas par la croissance cristalline qui va permettre de diminuer la concentration en protéine dans la goutte.

Cependant, la méthode reste empirique et les chances de réussite aléatoires tant les paramètres physico-chimiques intervenant sont nombreux. En effet, la solubilité d'une protéine dépend de nombreux paramètres tels que la concentration de la protéine, le pH de la solution qui influence la charge globale de la protéine, la température, la force ionique de la

solution, la présence d'ions (calcium, magnésium...), d'agents précipitants (sels, polymères (PEG), alcools...). L'idée directrice est de favoriser les interactions protéine-protéine, en brisant la sphère de solvation, pour induire la nucléation. Les conditions physico-chimiques qui favorisent cette interaction diffèrent d'une protéine à l'autre et doivent être déterminées empiriquement.

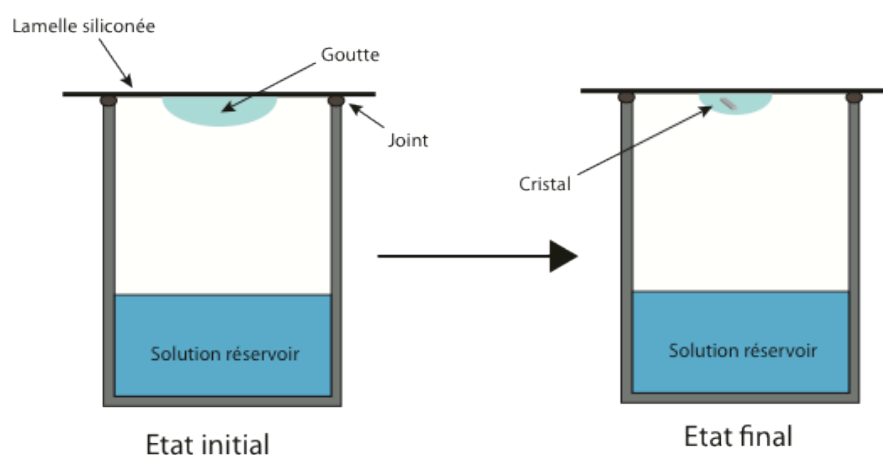


Figure 40 : Principe de la goutte suspendue.

## ***2) Stratégie générale de cristallisation***

Des essais de cristallisation ont été réalisés pour chacune des protéines produites à différentes concentrations allant de 2 mg/ml à 18 mg/ml. Les essais de cristallisation sont tout d'abord réalisés grâce à un robot de cristallisation à haut débit de la plateforme du PSB, HTXlab. Cette plateforme permet de tester rapidement près de 600 conditions de cristallisation en utilisant une quantité de protéine minimale grâce à miniaturisation du procédé de la méthode de la goutte assise (100 nl par goutte). Les boîtes de cristallisation peuvent être stockées à 4°C ou à 20°C et des images sont réalisées à différents intervalles pour pouvoir observer l'évolution des gouttes de cristallisation. Les essais de cristallisation ont été réalisés à la fois sur les protéines contenant l'étiquette hexahistidine et sur les protéines dont l'étiquette a été clivée (en page 102).

Les premiers essais permettent de déterminer les conditions les plus favorables à la cristallisation. Ces conditions sont ensuite reproduites manuellement et optimisées au laboratoire sur des plaques 24 ou 15 puits. Des plans factoriels incomplets et des gammes sont réalisés en faisant varier les différents paramètres des conditions initiales.

Afin d'augmenter les chances d'obtenir un cristal de protéine, des techniques de cristallogenèse plus « exotiques » ont aussi été mises en place.

### **(a) Méthylation des lysines**

La charge de surface des protéines joue un rôle important dans l'étape de cristallisation. Les lysines sont des résidus chargés positivement qui peuvent entraîner des forces de répulsion lors de l'empilement cristallin. La mutation de ces résidus par des résidus non chargés est une approche couramment utilisée pour améliorer la cristallisation, mais cela est long à mettre en œuvre et nécessite de cibler les lysines de surface. L'ingénierie de surface des protéines par modification chimique donne une bonne alternative à la mutagenèse pour permettre de réduire l'entropie de surface. Nous avons donc utilisé la méthode de méthylation réductrice des groupes amines libres dans lesquels les amines primaires (lysine et groupement N-terminal) sont modifiées en amine tertiaire (Walter, Meier et al. 2006; Kim, Quartey et al. 2008).

La protéine est diluée à 1 mg/ml dans du tampon 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl. 20 mM d'une solution de complexe diméthylamine-borane (ABC) et 40 mM de formaldéhyde sont ajoutés à la solution protéique, et laissé à incuber pendant 2 h à 4°C. Les deux solutions sont rajoutées encore une fois et laissées de nouveau à incuber pendant 2 h à 4°C puis 10 mM de solution ABC sont finalement rajoutés et laissé sur la nuit à 4°C. Le lendemain, une chromatographie d'exclusion de taille est réalisée dans un tampon 20 mM Tris pH8 100 mM NaCl afin de stopper la réaction grâce aux amines primaires contenus dans le Tris. La méthylation des lysines sera vérifiée par spectrométrie de masse, chaque lysine méthylée entraîne un incrément de masse de 28 Da.

### **(b) Protéolyse *in situ***

Les protéines contiennent souvent plusieurs domaines et des zones flexibles qui ne sont pas favorables à la cristallisation. L'identification de ces domaines et leur production séparée ont souvent permis d'obtenir la structure de protéines, mais cette méthode est longue à mettre en place et la détermination exacte des régions flexibles n'est pas forcément évidente. La détermination de ces domaines peut se faire de manière bioinformatique ou expérimentalement par protéolyse ménagée. Récemment, une nouvelle approche inspirée de la protéolyse ménagée a été décrite pour tenter d'obtenir de nouvelles structures, la protéolyse *in situ*.

Cette technique a permis de résoudre la structure de nombreuses protéines auparavant réfractaires à la cristallisation (Dong, Xu et al. 2007; Wernimont and Edwards 2009). Elle permet d'effectuer une protéolyse ménagée au sein même de la goutte de cristallisation en mélangeant dans la goutte la protéine entière avec une protéase. La digestion peut générer un



fragment structuré qui pourra alors cristalliser.

La protéolyse *in situ* a été testée sur la protéine ElmoWT avec différentes protéases : l'élastase, la subtilysine, la papaïne et la protéinase K. Les essais de cristallisation ont été effectués grâce au robot de cristallisation du PSB à 20°C, les protéases ont été ajoutées au dernier moment dans la solution de protéine ElmoWT à 10 mg/ml juste avant la préparation des gouttes de cristallisation. Chaque protéase est utilisée aux ratios massiques ElmoWT : protéase 1 :100 et 1 :1000. Le résultat de ces protéolyses a été analysé par SDS-PAGE et par spectrométrie de masse.

### ***3) Diffraction des rayons X par un cristal***

Avant d'être soumis aux rayons X il est nécessaire que les cristaux de protéines soient congelés dans l'azote liquide, de manière à limiter les dommages causés par les rayonnements ionisants. Pour cela, un trempage préalable des cristaux dans une solution cryo-protectrice (PEG, glycérol, huile minérale...) est réalisé afin de prévenir la formation de cristaux de glace, qui par des effets mécaniques, peuvent endommager le cristal de protéine.

Un cristal se caractérise par sa périodicité. Il est constitué d'un motif (une ou plusieurs molécules de protéine, par exemple) qui se répète par translation dans les trois dimensions de l'espace. C'est ce que l'on appelle la maille élémentaire du cristal. Celle-ci est décrite par trois vecteurs et trois angles de base. A l'intérieur de la maille, l'existence de relations de symétrie définit le système cristallin et le groupe d'espace auquel appartient le cristal. La périodicité est l'élément essentiel du phénomène de diffraction. Lorsqu'un cristal est soumis à un faisceau de rayons X, l'onde diffractée est la somme cohérente des ondes diffusées par chaque maille élémentaire dont le contenu est identique d'une maille à l'autre. Les ondes diffusées par les nuages électroniques des molécules de protéines subissent alors un phénomène d'interférences constructives et destructives, c'est la diffraction. L'intensité diffractée dans certaines directions de l'espace (interférences constructives) ou réflexions, est ainsi proportionnelle à la transformée de Fourier de la densité électronique contenue dans une seule maille. Le rayonnement incident a une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les distances inter-atomiques que l'on cherche à mesurer ce qui permet d'étudier la structure atomique des protéines. Dans la pratique, le cristal est placé dans un faisceau de rayons X et le phénomène de diffraction est observé grâce à un détecteur plan. L'instrumentation et le traitement des données permettent de mesurer l'intensité des réflexions et leurs positions dans l'espace de diffraction. Pour obtenir un jeu de données de réflexions complet, il est nécessaire d'enregistrer les intensités diffractées dans un espace minimal dépendant de la symétrie

cristalline. Pour cela, la méthode du cristal tournant, c'est à dire la rotation du cristal sur un axe parallèle au détecteur est appliquée. A cours de la rotation, les clichés de diffraction sont enregistrés.

L'étape finale d'une étude cristallographique est l'obtention de la densité électronique de la protéine. Cette carte est la transformée de Fourier des facteurs de structure obtenus à partir des intensités de diffraction mesurées. Expérimentalement, nous avons accès aux modules de ces facteurs de structure mais pas à leurs phases. Il est donc impossible de calculer directement la densité électronique. L'information de phase pourra être accessible grâce à des méthodes indirectes comme le remplacement moléculaire, le remplacement isomorphe multiple ou la diffusion anormale multi-longueurs d'onde.

## B . Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

### 1) *Principe*

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS : Small Angle X-rays Scattering) est une méthode d'analyse des structures et notamment des macromolécules biologiques qui permet de donner des informations sur la taille et la forme de la macromolécule en solution. Un faisceau monochromatique de rayons X illumine un échantillon, et diffuse élastiquement cette radiation incidente. L'intensité diffusée aux petits angles est mesurée sur un détecteur pour obtenir une courbe de diffusion. Cette courbe (intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion) est ensuite analysée et permet la détermination d'un modèle à basse résolution des macromolécules (Koch, Vachette et al. 2003).

Il est possible de définir les vecteurs suivants caractéristiques d'une expérience de diffusion de rayons X aux petits angles (Figure 41):

- $\vec{q}_0$  le vecteur d'onde incidente pour lequel  $|\vec{q}_0| = \frac{2\pi}{\lambda}$
- $\vec{q}_1$  le vecteur d'onde caractéristique de l'onde diffusée, dont la direction indique la direction d'observation. Dans le cas d'une diffusion élastique :  $|\vec{q}_1| = |\vec{q}_0|$
- $\vec{q}$  le vecteur de diffusion,  $\vec{q} = \vec{q}_1 - \vec{q}_0$  et son module  $q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$  où  $2\theta$  est l'angle de diffusion mesuré par rapport à la direction du faisceau incident et  $\lambda$  la longueur d'onde de la

radiation incidente.

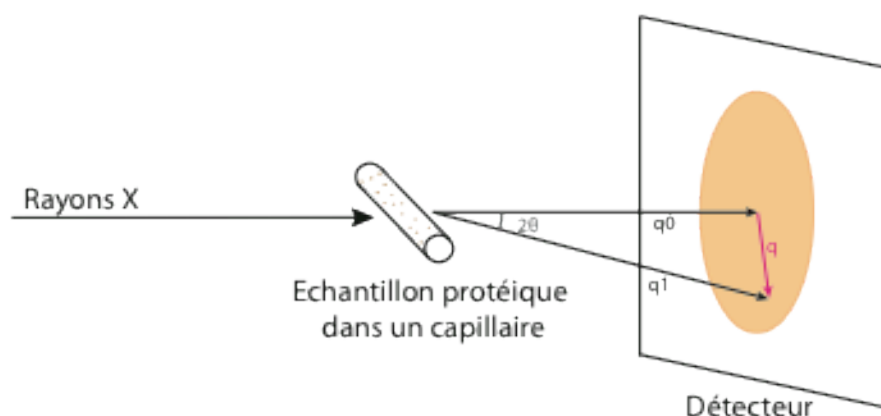


Figure 41 : Schéma de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

L'intensité mesurée résulte de la moyenne des intensités diffusées par toutes les molécules présentes dans le faisceau de rayons X. Toute la difficulté de cette technique réside dans le fait que ces molécules sont toutes dans des orientations différentes. À partir d'une mesure moyenne en une seule dimension, il faut extraire de l'information structurale en trois dimensions. Nous allons voir ici comment cela est possible et quels paramètres structuraux nous pouvons obtenir.

## 2) *Détermination des paramètres structuraux*

Aux très petits angles, dans le domaine de Guinier pour lesquels  $R_g q < 1,3$ , en supposant qu'une seule espèce soit présente en solution, la loi de Guinier (ci-dessous) permet de déterminer deux paramètres :  $\ln I(0)$  qui est l'ordonnée à l'origine et  $R_g^2/3$  qui est la pente.

$$\ln I(q) \approx \ln I(0) - \left(\frac{R_g^2}{3}\right)q^2$$

### (a) *La masse moléculaire*

L'intensité  $I(0)$  diffusée à  $q = 0$ , normalisée par la concentration  $C$  de la solution est proportionnelle à la masse moléculaire de la particule étudiée. Grâce à une calibration avec une protéine standard connue, ici la BSA, on peut déterminer la masse moléculaire de la protéine étudiée.

$$I_{prot}(0) = I_{BSA}(0) \frac{C_{prot} M_{prot}}{C_{BSA} M_{BSA}}$$

### (b) *Le rayon de giration*

La pente de la droite  $\ln I(q)$  en fonction de  $q^2$  permet de calculer le rayon de giration

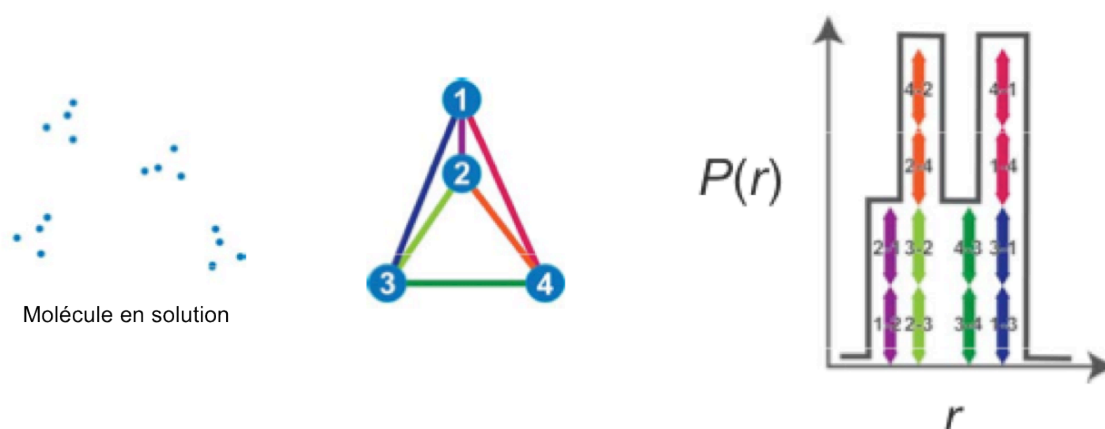
de l'espèce diffusante. On considère que cette relation n'est valable que dans un domaine restreint de  $q$ , typiquement  $q.R_g < 1,3$ . Ce rayon de giration fournit une première indication sur la taille de la particule. En effet, pour un volume et une masse moléculaire donnés, une molécule avec un rayon de giration le plus petit possible correspond à une sphère de même volume. Plus le  $R_g$  est grand, à volume constant, moins la particule est sphérique.

### (c) Fonction de distribution des distances

L'intensité mesurée permet de calculer la fonction  $p(r)$ . Elle représente un histogramme de distribution des distances entre paires d'atomes intramoléculaires. Elle contient les mêmes informations que  $I(q)$  et se définit comme :

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} q^2 dq$$

La fonction  $p(r)$  est égale à zéro pour les distances supérieures à la distance maximale de la particule  $D_{\max}$ . Le calcul de la fonction  $p(r)$  à partir des données d'intensité de diffusion, s'effectue selon des méthodes de transformation de Fourier indirecte introduites pour la première fois par O. Glatter (Laggner, Glatter et al. 1977) et dont plusieurs versions sont proposées dans différents programmes de calculs. Nous avons utilisé le programme GNOM, mis au point par Dr. Dimitri Svergun (Svergun 1992). De la fonction de distribution des distances  $p(r)$ , nous pouvons là aussi calculer les valeurs de  $I(0)$  et de  $R_g$ . La détermination des paramètres  $I(0)$  et  $R_g$  est moins sensible que la méthode de Guinier en ce qui concerne les interactions avec les molécules et la présence d'oligomères en solution, puisque la méthode tient compte de toute la courbe de diffusion et non pas des points aux très petits angles.



**Figure 42 : Représentation de la fonction de distribution des distances.** Etude d'une molécule théorique en deux dimensions composée de 4 atomes. La fonction de distribution des distances rassemble toutes les distances intraatomiques. Ainsi, toutes les distances équivalentes dans la molécule de 4 atomes sont additionnées, d'après (Putnam, Hammel et al. 2007).

L'allure de la fonction  $p(r)$  permet d'évaluer quelques caractéristiques de la forme globale de la molécule étudiée : les molécules globulaires ont une  $p(r)$  en forme de cloche, dont le maximum correspond à  $D_{\max}/2$  ; les particules allongées ont un maximum pour  $r < D_{\max}$  alors que les particules trouées présentent un maximum pour  $r > D_{\max}/2$ .

### ***3) Estimation de l'intensité diffusée à partir d'un modèle***

L'intensité théorique diffusée peut être calculée à partir d'un modèle 3D de molécule. Ce calcul est essentiel, soit pour contrôler que la structure de la molécule étudiée en solution est comparable à celle déposée dans la PDB (programme CRY SOL, par exemple), soit pour générer des modèles dont l'intensité théorique diffusée est aussi proche que possible de l'intensité diffusée mesurée expérimentalement (programmes SASREF, DAMMIF et BUNCH par exemple).

Pour un ensemble d'atomes, qu'il s'agisse de vrais atomes (structure cristallographique, par exemple extraite de la PDB) ou de pseudo-atomes (enveloppe à basse résolution déterminée par le programme DAMMIF), l'intensité diffusée peut être calculée par la formule de Debye :

$$I(q) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}$$

où  $N$  est le nombre d'atomes ou pseudo atomes,  $r_{ij}$  la distance entre l'atome  $i$  et l'atome  $j$ , et  $f_i(q)$  le facteur de diffusion ou facteur de forme de l'atome  $i$  :

$$f_i(q) = 4\pi \int \rho(r_i) r_i^2 \frac{\sin(qr_i)}{qr_i} dr_i$$

avec  $\rho(r)$  la distribution radiale de densité électronique de l'atome.

Une autre approche, utilisée notamment par le programme CRY SOL, consiste à utiliser un développement en harmonique sphérique de la densité électronique de la molécule étudiée :

$$\rho(\mathbf{r}) \approx \rho_L(\mathbf{r}) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l \rho_{lm}(r) Y_{lm}(\omega)$$

où :

$$\rho_{lm}(r) = \int \rho(\mathbf{r}) Y_{lm}(\omega) d\omega$$

L'ordre L du développement utilisé est typiquement 15 ou 17.

L'amplitude diffusée par une telle densité électronique peut aussi s'exprimer sous la forme d'un tel développement :

$$A(\mathbf{q}) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l A_{lm}(q) Y_{lm}(\mathbf{\Omega})$$

où  $A_{lm}(q)$  se calcule de la façon suivante :

$$A_{lm}(q) = i^l \frac{\sqrt{2}}{\pi} \int j_l(qr) \rho_{lm}(r) r^2 dr$$

( $j_l$  est une fonction de Bessel sphérique)

L'intensité diffusée par une telle densité électronique s'exprime alors simplement en fonction des fonctions  $A_{lm}$  :

$$I(q) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l |A_{lm}(q)|^2$$

L'avantage de cette approche est de permettre le contrôle du nombre de paramètres décrivant le modèle (ordre L) et le temps de calcul réduit, dès que le nombre d'atomes est important. Pour de plus amples détails, le lecteur peut se référer à l'article de Koch et al, (2003).

L'accord entre l'intensité théorique diffusée et l'intensité diffusée mesurée expérimentalement est évalué par l'indicateur statistique Chi.

#### ***4) Enregistrement des données***

Les expériences sont réalisées à l'ESRF sur la ligne de lumière ID14-3 à une énergie de travail de 12,5 KeV qui correspond à une longueur d'onde  $\lambda=0,992$  Å. La ligne est équipée d'un chargeur d'échantillon automatique, et elle permet d'accéder à un domaine de q de 0,01 à 5 nm<sup>-1</sup>. Il est important que l'échantillon protéique soit monodisperse (un seul état oligomérique), pour cela nous avons effectué une chromatographie d'exclusion de taille juste

avant les expériences de SAXS et en parallèle de certaines pour vérifier l'état d'oligomérisation de la protéine au moment même de l'expérience. L'échantillon est injecté dans un capillaire, une série de 10 spectres de 10 secondes chacun est enregistrée sur un échantillon d'environ 90  $\mu$ l en flux continu à 10°C pour éviter les dommages aux radiations. Pour chaque échantillon protéique, une série de mesures avec le tampon seul est aussi réalisée avant et après celle de la protéine, afin de servir de référence. Une série de mesures est enregistrée avec de la BSA à 1 mg/ml pour calibrer l'intensité  $I(0)$  (en page 129) et plusieurs concentrations de chaque protéine sont analysées.

### 5) *Analyse des données*

Les données sont traitées et analysées grâce à la suite de programme ATSAS développée par l'équipe de Svergun à l'EMBL Hambourg (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>).

#### (a) *Traitement des courbes*

Les courbes sont traitées avec le programme PRIMUS (Konarev 2003). Les dix courbes de chaque série sont moyennées et les courbes de tampon soustraites. Ce logiciel permet également de déterminer les valeurs du rayon de giration ( $R_g$ ) et de  $I(0)$  par le calcul de la courbe de Guinier. La relation linéaire entre le logarithme de l'intensité, et la valeur de  $q^2$ , renseigne sur la présence d'agrégats dans l'échantillon. Ils peuvent être dus à des dégâts d'irradiation qui créent des radicaux libres.

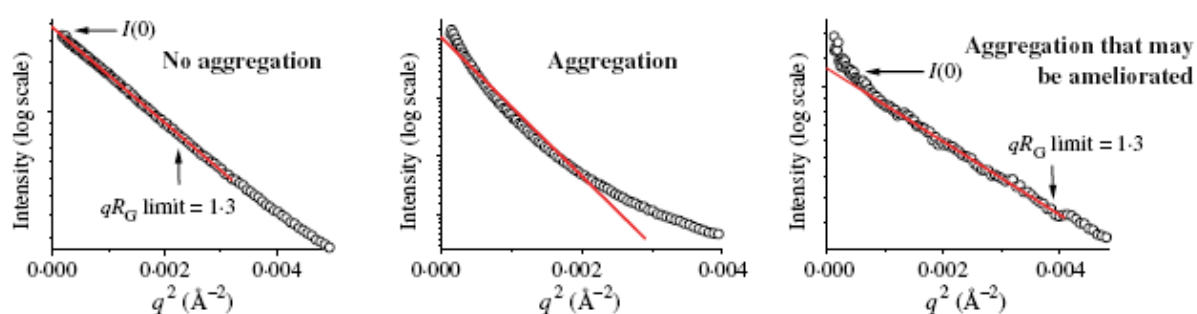


Figure 43 : Courbe de Guinier et agrégation.

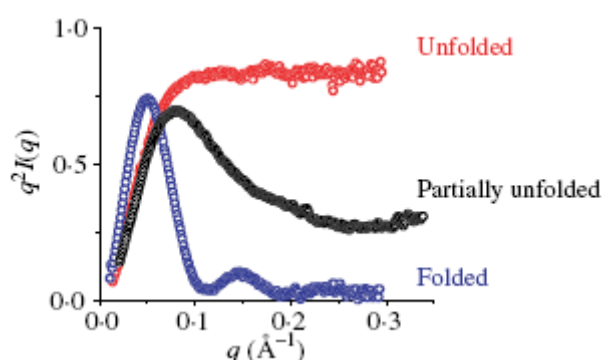
Une relation non linéaire entre  $\log I(q)$  et  $q^2$  indique la présence d'agrégation. L'agrégation de l'échantillon peut être réduite ou éliminée en modifiant les conditions de tampon, par centrifugation ou filtration. D'après (Putnam, Hammel et al. 2007)

Les courbes correspondant aux différentes concentrations utilisées sont mises à l'échelle et fusionnées pour former une courbe « chimère ». Pour les courbes de faible concentration, les intensités aux plus grands angles sont trop faibles et d'un niveau équivalent

au bruit de fond et seront donc écartées. Il en est de même pour les courbes de forte concentration où un phénomène d'interférence entre les particules apparaît parfois montrant une certaine agrégation, dans ces cas les intensités aux plus petits angles seront aussi écartées.

### **(b) Analyse et évaluation des données**

La courbe de Kratky qui représente la variation de  $q^2 \cdot I(q)$  en fonction de  $q$ , permet d'identifier si les échantillons sont bien structurés. Les macromolécules globulaires suivent les lois de Porod et ont une courbe en forme de cloche. Les molécules étendues, comme les protéines non repliées perdent ce pic et atteignent un plateau ou décrivent une légère augmentation dans la plus grande gamme de  $q$  (Figure 44).



**Figure 44 : Courbe de Kratky.**

**Comparaison de courbes de protéines structurées, non structurées ou partiellement structurées. D'après (Putnam, Hammel et al. 2007).**

Le programme GNOM (Svergun 1992) va ensuite permettre d'évaluer la fonction de distribution des distances atomiques  $p(r)$  nous permettant entre autres de déterminer la valeur  $D_{\max}$ , soit la valeur de  $r$  telle que  $P(r)=0$ . Elle représente la distance intramoléculaire maximale en solution. Pour une taille donnée, cette valeur sera donc d'autant plus importante que la protéine est allongée.

### **(c) Modélisation *ab initio***

Pour construire les enveloppes des molécules en trois dimensions, le programme de détermination *ab initio* DAMMIF (Franke and Svergun 2009) a été utilisé. Les modèles ont été obtenus sans imposer de symétrie, à partir d'une sphère de diamètre équivalent à  $D_{\max}$  estimée avec GNOM composée de billes représentant des carbones alpha « fictifs ». Une procédure de recuit simulé est utilisée pour déterminer l'appartenance de chaque bille à la protéine ou au tampon. Ceci se fait tout en minimisant l'écart entre les données expérimentales et les données calculées.



La méthode de détermination de l'enveloppe de la particule utilisant le recuit simulé montre que plusieurs solutions sont possibles à partir d'une même courbe de diffusion. Il est donc nécessaire d'exécuter un grand nombre de fois le programme pour obtenir une bonne représentation de tous les modèles de molécule possibles. Pour chaque protéine, 40 modèles ont été construits puis comparés grâce au programme DAMAVER (Volkov and Svergun 2003). Ce programme aligne les différents modèles deux à deux et détermine une pseudo-distance (Normalized Spacial Discrepancy ou NSD) entre les modèles et un modèle choisi comme référence, pour permettre de générer une solution unique moyenne.

#### ***(d) Modélisation d'oligomères***

Le programme SASREF permet de faire une modélisation d'un complexe formé de sous-unités de structure atomique connue à partir des données de diffusion en solution de ce complexe. Il permet notamment de prendre en compte la symétrie du complexe (Petoukhov and Svergun 2005).

Ce programme a été utilisé pour déterminer un modèle pour la protéine Elmo $\Delta$ N qui forme un dimère en solution. Plusieurs modèles ont été construits et comparés grâce à la valeur statistique Chi, qui permet d'évaluer la concordance du modèle théorique avec les données expérimentales.

#### ***(e) Modélisation à partir de données structurales partielles***

Le programme BUNCH permet de calculer un modèle de la protéine en utilisant la description atomique à haute résolution des domaines connus et des pseudo-résidus pour les parties inconnues. Ce programme détermine la position et l'orientation relative des domaines ainsi que la forme probable des parties inconnues de telle manière que la courbe de diffusion calculée de l'ensemble soit aussi proche que possible de la courbe expérimentale sous des contraintes de connectivité et de compacité (pour la partie inconnue).

Nous avons utilisé le programme BUNCH (Petoukhov, Eady et al. 2002; Petoukhov and Svergun 2005) pour modéliser ElmoWT en partant de la structure cristallographique de la région C-terminale (résidus 532-727) (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012) (code pdb : 3A98).

#### ***(f) Superposition des modèles***

La superposition des différents modèles à basse résolution entre eux ou avec les structures atomiques connues a été réalisée en utilisant le programme SUPCOMB (Kozin and Svergun 2001). Ce programme permet de trouver la meilleure superposition des modèles *ab*

*initio* entre eux ou avec les structures à haute résolution. Il va chercher à minimiser la pseudo-distance NSD des modèles qui permettra d'avoir une estimation quantitative de la similarité des modèles.

## Résultats et Discussion

---



# I . Production et caractérisation des protéines

La production d'une protéine recombinante est essentielle à toute étude. Cette production se divise en plusieurs étapes : la construction du gène d'intérêt, son clonage dans un vecteur d'expression, sa surexpression, et enfin la purification de la protéine.

La construction du gène d'intérêt est une étape clé, il est important de connaître le but et quelles techniques seront utilisées pour étudier cette protéine afin d'adapter sa construction en y rajoutant par exemple des étiquettes spécifiques. L'étape finale de purification permet ensuite d'obtenir un échantillon protéique d'une grande qualité (pur, homogène et monodisperse) et en grande quantité pour obtenir une analyse elle aussi de bonne qualité. L'analyse des échantillons protéiques par différentes méthodes biochimiques et biophysiques permettent de vérifier ces différents paramètres.

Lors de cette thèse de nombreuses constructions de protéines ont été produites afin de mener les différentes études nécessaires à la compréhension du mécanisme de régulation de l'activité de Dock par Elmo. Nous allons ici présenter les étapes de production et la caractérisation biochimique et biophysique de ces protéines.

## A . Production des protéines Elmo1

A mon arrivée dans le laboratoire, le protocole de production de la protéine ElmoWT avait déjà été mise en place par Anne Chouquet et Jean-Baptiste Reiser. Une approche d'étude par domaines de cette protéine a été initiée par protéolyse ménagée. La digestion par la Protéinase K et la Trypsine a permis de mettre en évidence 3 sites de coupure privilégiés (Figure 45). A partir de l'identification de ces sites, nous avons entrepris la production des différents fragments qui en résultent. L'étude par SPR de l'interaction de ces fragments avec le domaine SH3 de Dock1 nous a conduits à mettre en place différentes stratégies qui ont nécessité l'introduction d'étiquettes spécifiques aux différents fragments de Elmo1 et de Dock.

### *1) Clonage des gènes*

Le détail des étapes de clonage des différentes constructions est décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes en page 79.

### (a) Les fragments de Elmo1

Nous avons construit par clonage LIC (en page 86) tous les fragments possibles identifiés par la protéolyse ménagée (Figure 45). Des fragments dont la région C-terminale (résidus 676-727) est supprimée ont aussi été construits de la même manière. Tous ces fragments possèdent une étiquette hexahistidine à l'extrémité N-terminale, et sont insérés dans le vecteur d'expression bactérienne pPROEXHTb (Figure 45).

Deux fragments supplémentaires de Elmo1 ont été construits par mutagenèse dirigée (en page 89), il s'agit des fragments Elmo $\Delta$ PxxP et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP, dont le motif PxxP C-terminal (résidus 708-727) a été supprimé (Figure 45).

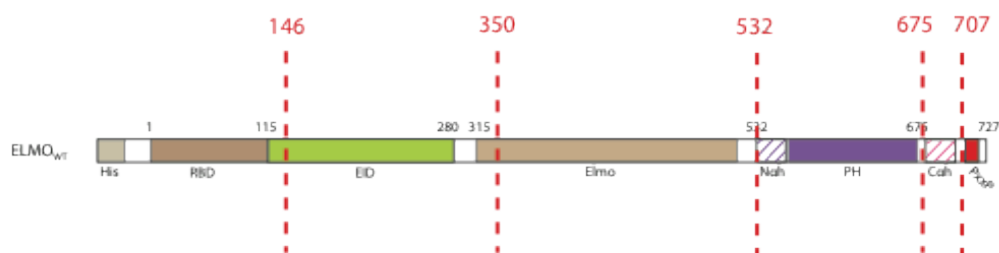


Figure 45 : Sites de coupure de ElmoWT utilisé pour définir les fragments.

Les sites de coupure sont notés en rouge. Les trois sites déterminés par la protéolyse ménagée sont 146, 350 et 532.

### (b) Les constructions spécifiques pour l'étude par SPR

Au cours des expériences de SPR que nous avons réalisées, de nombreuses stratégies d'études ont dû être mises en place. Ces différentes méthodes ont parfois nécessité la production de nouvelles constructions des protéines Elmo1 et Dock1 pour insérer des étiquettes spécifiques qui permettent une immobilisation orientée sur la puce.

#### (i) Étiquette décahistidine

Nous avons essayé d'insérer une étiquette décahistidine aux fragments ElmoWT, Elmo $\Delta$ C, Elmo $\Delta$ N et ElmoPH par deux approches (en page 90) de mutagenèse dirigée. La première, n'a pas donné de résultats positifs. La seconde n'a actuellement pas encore été finalisée.

#### (ii) Étiquette de biotinylation

Une étiquette de biotinylation a été insérée dans la région N-terminale des fragments ElmoWT, Elmo $\Delta$ C, Elmo $\Delta$ N et ElmoPH, entre le site de coupure à la TEV et le début de la séquence de la protéine. L'étiquette hexahistidine est toujours présente à l'extrémité N-terminale pour permettre de purifier les protéines qui sont ainsi appelées ElmoWT-BirA,

Elmo $\Delta$ C-BirA, Elmo $\Delta$ N-BirA et ElmoPH-BirA.

## 2) *Expression et purification*

Une fois les nouvelles constructions des fragments produites, des tests d'expression doivent être effectués pour déterminer si les protéines sont exprimées et sous quelle forme (soluble ou non soluble). Ces tests permettent notamment d'ajuster le protocole d'expression pour chaque fragment. Une fois les meilleures conditions déterminées, une production en grand volume est réalisée, suivie de la purification de ces fragments.

### (a) *Tests d'expression et de solubilité*

Des essais d'expression pour chaque fragment de Elmo1 sont entrepris. Une souche d'expression *E.coli* BL21(DE3) est transformée pour chaque plasmide avant d'être mise en culture en petit volume. Différentes températures et durées d'induction sont testées, la lyse bactérienne a été réalisée dans un tampon PBS pH 8 les résultats sont rassemblés dans le Tableau XXIII.

Température	18 °C	30 °C	37 °C
Durée	20 heures	5 heures	3 heures
Elmo $\Delta$ PxxP (1-707)	-	++	+++
Elmo $\Delta$ C (1-675)	+	+++	+++
ElmoN (1-532)	++	+++	+++
Elmo1-350	-	-	-
Elmo1-146	-	-	-
Elmo $\Delta$ N (532-727)	-	++	+++
Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP (532-707)	-	++	+++
ElmoPH (532-675)	-	++	+
Elmo350-727	-	-	-
Elmo350-675	-	-	-
Elmo350-532	-	-	-
Elmo146-727	-	-	-
Elmo146-675	-	-	-
Elmo146-532	-	-	-
Elmo146-350	-	-	-

Tableau XXIII : Détermination des conditions d'expression de façon soluble des fragments de Elmo1. En vert, la meilleure condition d'expression des fragments solubles.

Les 15 fragments testés s'expriment tous au sein des bactéries, toutefois, seulement 6 s'expriment de façon soluble (Figure 46). Pour les 9 fragments non solubles, un nouveau test de solubilité est alors réalisé en utilisant la souche bactérienne d'expression *E.coli* BL21(DE3) RIL qui permet la transcription de codons rares. Ces tests n'ont pas permis d'obtenir l'expression soluble de ces fragments protéiques. Cependant, l'interaction entre Elmo1 et Dock1 étant portée par la région C-terminale de Elmo1, les fragments solubles identifiés semblent être donc suffisant à l'étude de cette interaction.

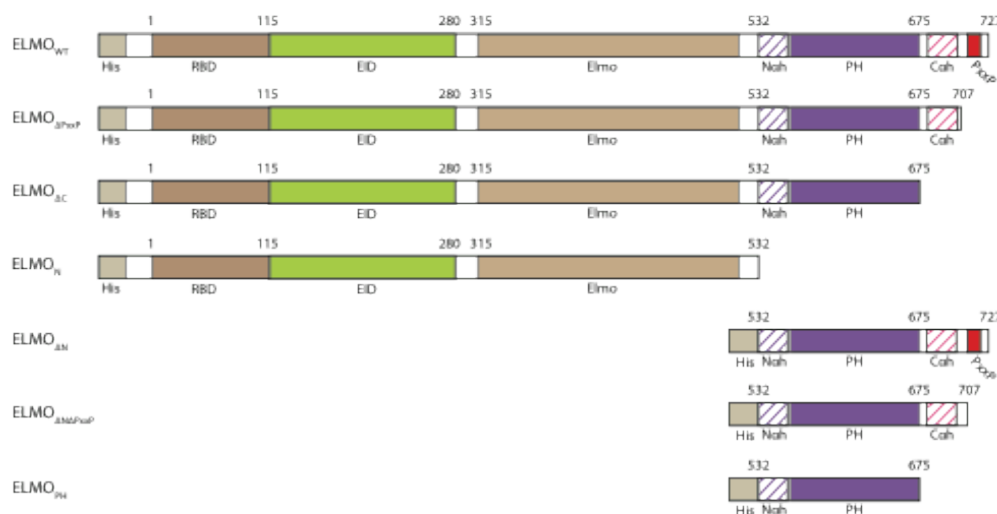


Figure 46 : Fragments de Elmo1 qui s'expriment et sont solubles.

Des essais de purification en petit volume des 6 fragments solubles sont réalisés grâce à une chromatographie d'affinité au Nickel. Tous les fragments se fixent sur la colonne, et sont élués par compétition avec une solution d'imidazole à 250 mM. Une production en grand volume de ces fragments a donc pu être mise en place.

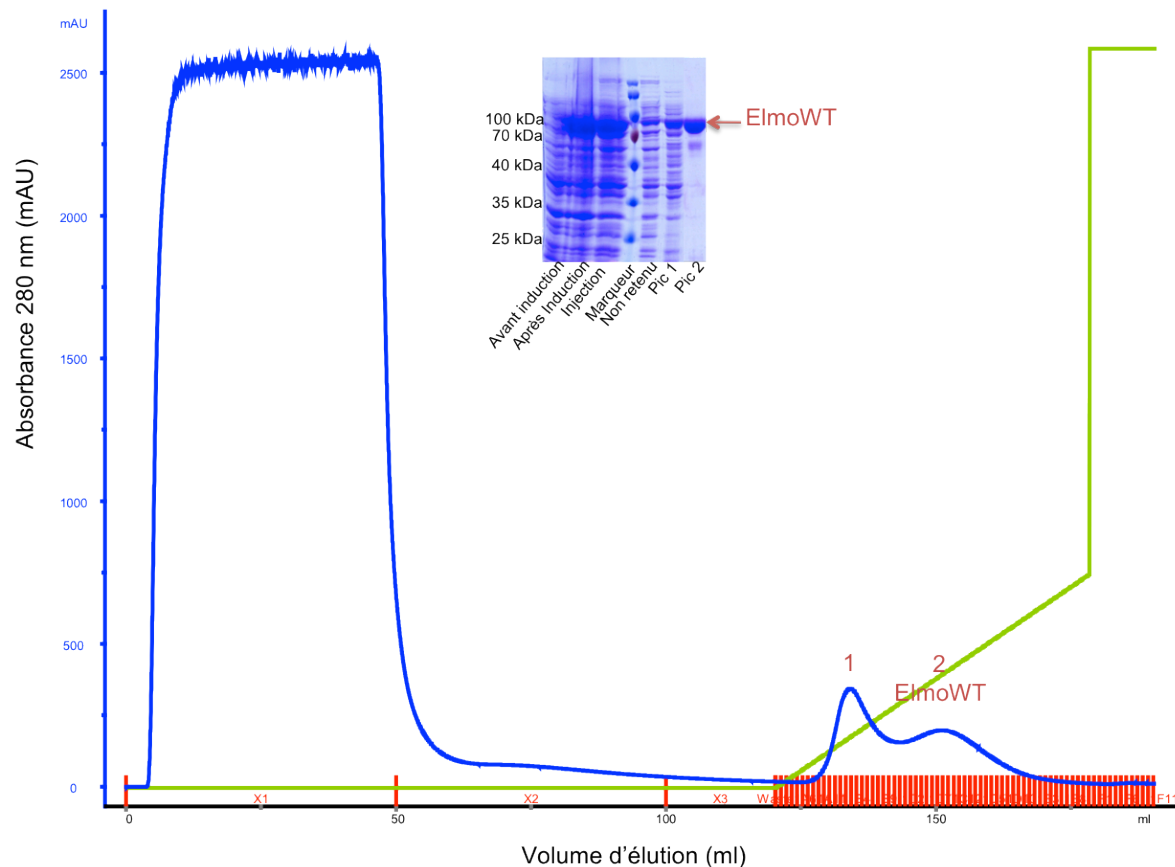
### (b) Purification

La purification de chaque fragment de Elmo1 se fait par le même protocole que la protéine ElmoWT. Les fragments possèdent tous une étiquette hexahistidine à l'extrémité N-terminale qui a permis de réaliser une première étape de purification par chromatographie d'affinité au Nickel. Les différentes espèces oligomériques et les agrégats ont été ensuite séparés par chromatographie d'exclusion de taille.



### (i) Chromatographie d'affinité

Tous les fragments de Elmo1 ont montré le même comportement lors de la chromatographie d'affinité. Le profil d'élution montre deux pics, après analyse par SDS-PAGE nous pouvons observer que les deux pics contiennent le fragment de Elmo1 analysé (Figure 47). Cependant le premier pic est très contaminé par d'autres protéines, nous pouvons penser qu'il s'agit de protéines qui ont des interactions non spécifiques avec la résine de la colonne. Le second pic montre le fragment de Elmo1 purifié, il reste toutefois quelques contaminants qui pourront être séparés lors de l'étape suivante de chromatographie d'exclusion de taille.



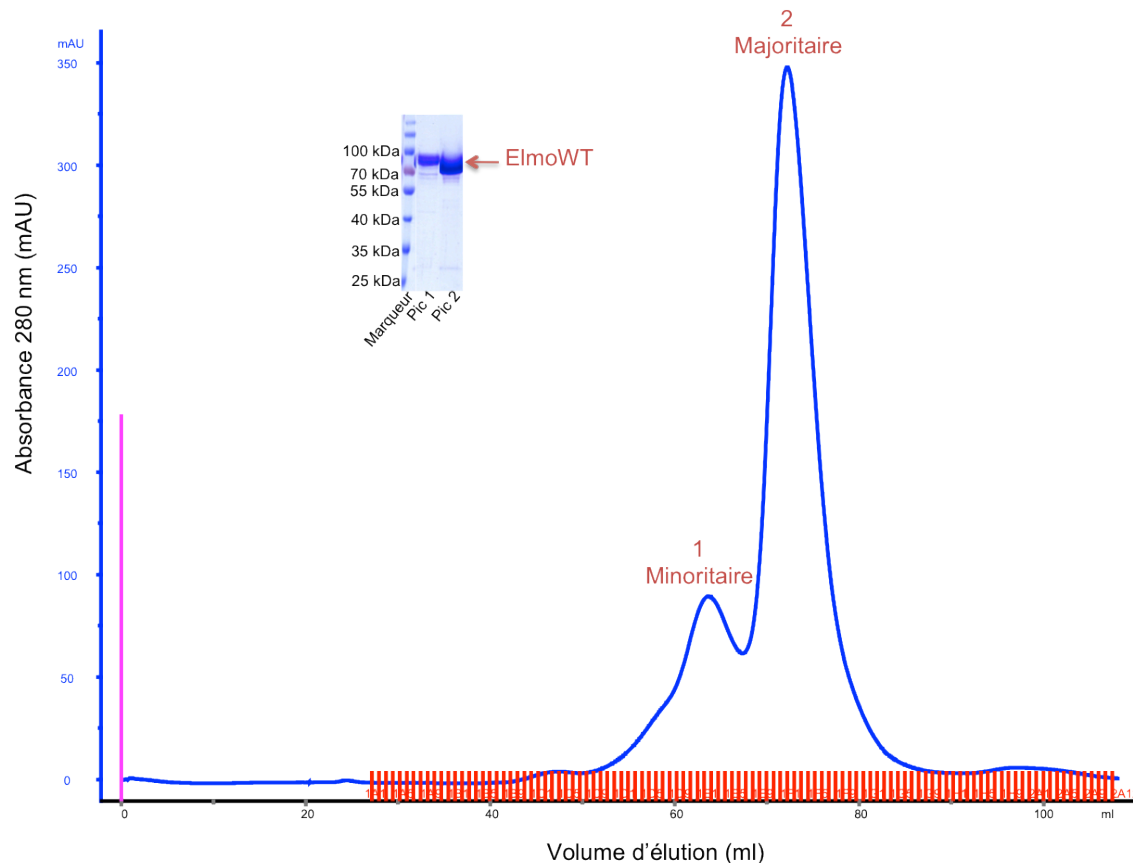
**Figure 47 : Chromatographie d'affinité de ElmoWT.**

Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole.

### (ii) Chromatographie d'exclusion de taille

Les fractions issues du second pic de la chromatographie d'affinité ont été regroupées puis injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille. Pour chacun des fragments de Elmo1, le profil d'élution présente deux pics (Figure 48). Un premier pic de

faible hauteur d'absorbance dit minoritaire et un second pic de plus grande hauteur d'absorbance dit majoritaire. L'analyse par SDS-PAGE montre que le fragment de Elmo1 étudié est présent sous chacun de ces pics. D'après la calibration de la colonne de chromatographie utilisée, ces volumes d'élution correspondent aux formes monomériques (majoritaire) et dimériques (minoritaire).



**Figure 48 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT.**  
Colonne superdex 200 16/60. Un profil similaire est observé pour les autres fragments de Elmo1.

### (iii) Biotinylation

Les fragments ElmoWT-BirA, Elmo $\Delta$ C-BirA, Elmo $\Delta$ N-BirA et ElmoPH-BirA sont destinés à être biotinylés dans le but d'orienter leur fixation sur la puce lors de l'étude de l'interaction par SPR. La biotinylation est réalisée par l'enzyme BirA dans les conditions décrites en page 106, suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille qui permet de séparer le fragment de Elmo1 de l'enzyme mais aussi de changer de tampon.

### 3) *Caractérisation après purification*

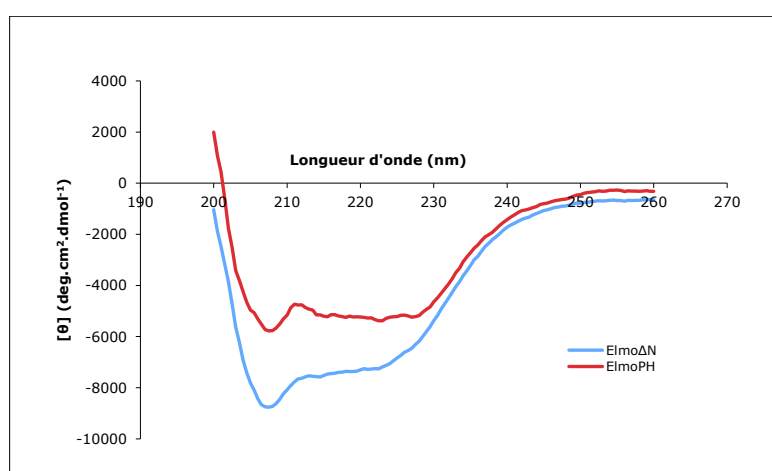
#### (a) *Identification de la protéine*

Pour chaque nouveau fragment protéique produit, une analyse de sa masse par spectrométrie de masse a été réalisée afin de vérifier l'intégrité de la protéine. Nous nous sommes rendus compte que pour les fragments longs de Elmo1 (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP), une masse légèrement inférieure à celle attendue était déterminée lorsque l'expérience de spectrométrie de masse était réalisée plusieurs jours après la purification. Il est possible qu'une dégradation se soit produite.

Un séquençage N-terminal sur un échantillon ElmoWT préparé plusieurs jours plus tôt a permis d'identifier une délétion de 28 résidus à l'extrémité N-terminale. La protéine perd ainsi son étiquette histidine quelques jours après sa production. Ce phénomène n'a pas été remarqué sur les fragments courts de Elmo1 (Elmo $\Delta$ N, ElmoPH et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP)

#### (b) *Etat conformationnel par Dichroïsme Circulaire*

L'état conformationnel des différents fragments est analysé par dichroïsme circulaire. Cette technique permet de mettre en évidence la présence de structures secondaires dans les protéines. Pour chaque fragment étudié, la courbe est caractéristique d'une protéine structurée, comme nous pouvons le voir par exemple pour les fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH sur la Figure 49.



**Figure 49 : Dichroïsme circulaire des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH.**

Enregistrements à 25°C, dans du tampon 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl. Les fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH possèdent un spectre en dichroïsme circulaire caractéristique de la présence de structures secondaires.

### (c) Etat oligomérique

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la chromatographie d'exclusion de taille des fragments de Elmo1, en plus du monomère majoritaire, des oligomères sont présents. Dans la littérature, aucune information n'a été rapportée sur cet état oligomérique en solution. Le volume d'élution semble montrer une protéine sous forme de dimère dans le pic d'élution minoritaire de la chromatographie d'exclusion de taille.

La proportion des deux espèces fait penser à un équilibre. Une seconde chromatographie d'exclusion de taille dans les heures suivant sa purification, montre que la protéine monomérique purifiée et séparée des oligomères, reforme des oligomères. Il en est de même pour la forme oligomérisée qui se dissocie pour former des monomères.

L'état d'oligomérisation des échantillons protéiques est déterminé par SEC-MALLS. Cette technique permet de déterminer avec précision la masse des protéines présentes lors de l'élution d'une chromatographie d'exclusion de taille. Des essais de pontage chimique pour stabiliser cette protéine oligomérisée ont aussi été réalisés sans succès.

#### (i) SEC-MALLS

Les expériences de SEC-MALLS sur l'échantillon de protéine ElmoWT ont été réalisées avec l'aide de Marc Jamin (UVHCI). Des expériences complémentaires sur les fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoN ont été effectuées par Rida Awad avec l'aide de Julien Perard.

Après avoir purifié la protéine ElmoWT selon le protocole décrit plus tôt, les fractions de chaque pic sont regroupées séparément puis analysées par MALLS (Figure 50).

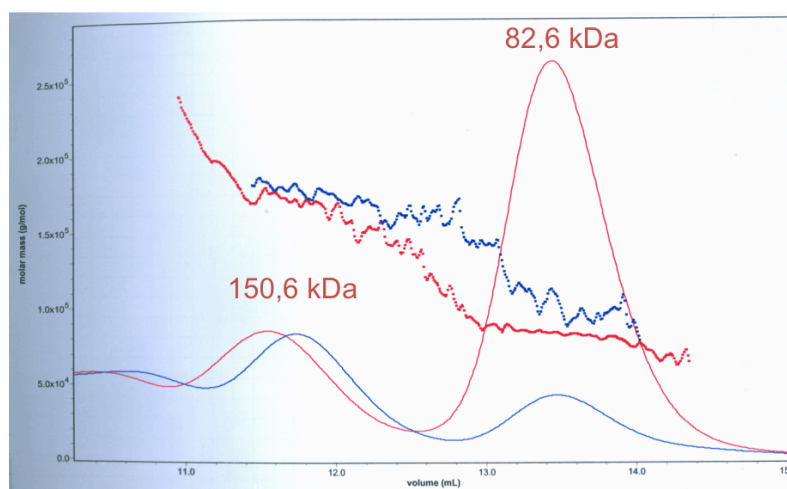


Figure 50 : Superposition des courbes de SEC-MALLS de ElmoWT.

En rouge, échantillon protéique issu de la fraction majoritaire de chromatographie d'exclusion de taille. En bleu, échantillon protéique issu de la fraction minoritaire de la même chromatographie d'exclusion de taille.

Masse théorique (kDa)		Masse calculée (kDa)	
Monomère	Dimère	Monomère	Dimère
87,4	174,7	82,6	150,6

**Tableau XXIV : Masses molaires calculées par SEC-MALLS des deux pics de chromatographie d'exclusion de taille.**

**Le pic minoritaire correspond à un dimère, le pic majoritaire à un monomère de la protéine ElmoWT.**

Les résultats confirment la présence d'un monomère sous le pic majoritaire et d'un dimère sous le pic minoritaire (Tableau XXIV). Nous pouvons aussi voir qu'un équilibre monomère/dimère est en train de se former, on retrouve la présence de dimère dans l'échantillon où nous avons regroupé les fractions du monomère, et vice versa pour l'échantillon du dimère où l'on retrouve du monomère.

Les expériences réalisées par Rida Awad sur les fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoN montrent que ces fragments sont élués sous forme de monomère.

## (ii) Pontage chimique

Le pontage chimique permet de fixer de manière covalente un complexe de protéine. Cela permettrait de stabiliser la forme dimérique des fragments de Elmo1 en vue de les étudier. En effet, la plupart des techniques d'analyses de protéine nécessitent des échantillons monodisperses, et l'équilibre monomère/dimère des fragments de Elmo1 n'est donc pas idéal.

Nous avons dans un premier temps réalisé des essais de pontage chimique sur la protéine entière ElmoWT avec de l'éthylglycylsuccinamide (EGS). Malheureusement, après analyse par SDS-PAGE il n'a pas été possible de visualiser un complexe protéique (Figure 51). Nous pouvons toutefois noter que l'ajout de l'agent pontant entraîne la disparition de la bande de la protéine à 90 kDa, une trainée à très haut poids moléculaire apparaît comme si des agrégats ou des espèces protéiques de très grande taille se sont formés et n'entrent pas dans le gel. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de ponter des fragments courts (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH) pour limiter ce problème de complexes de trop grande taille avec de l'EGS ou du glutaraldéhyde. Malheureusement nous nous sommes confrontés aux mêmes problèmes (Figure 52).

Le pontage chimique n'a pas permis d'isoler et de stabiliser la forme dimérique des fragments de Elmo1. L'agent pontant semble entraîner un phénomène d'agrégation.

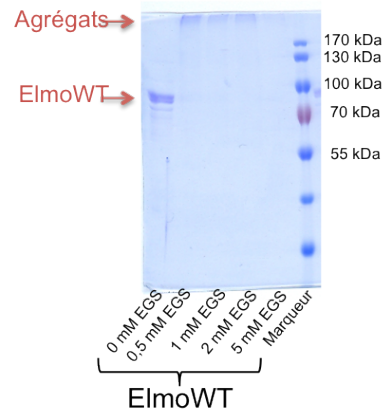
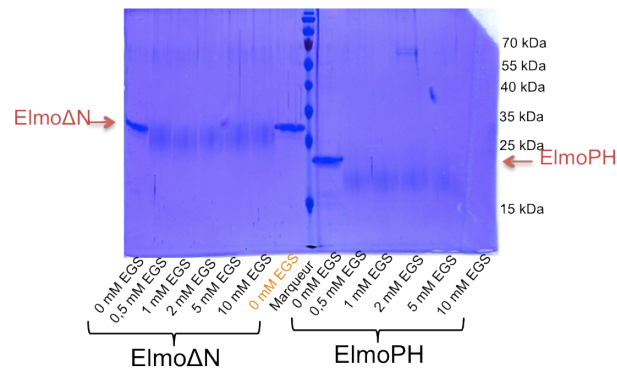


Figure 51 : Analyse SDS-PAGE de ElmoWT après pontage chimique par l'EGS.

A



B

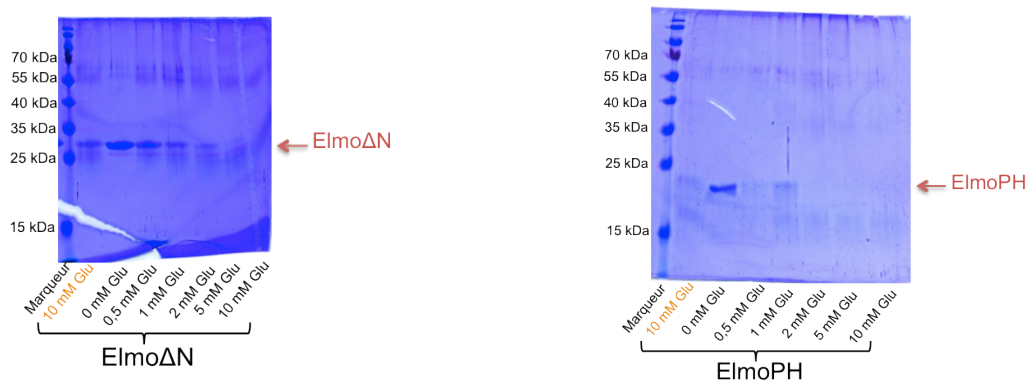


Figure 52 : Analyse SDS-PAGE de ElmoΔN et ElmoPH après pontage chimique par l'EGS en (A) et par le glutaraldéhyde (Glu) en (B).

En orange les échantillons qui n'ont pas subi d'incubation pendant 30 min. Les bandes sombres autour de 60 kDa sont un artéfact des SDS-PAGE présent dans de nombreux gels au cours de ma thèse.

## B . Production des protéines Dock

Dock est une très grosse protéine, elle fait environ 180 kDa, et se divise en plusieurs domaines (en page 57). La production d'une protéine de cette taille n'est pas évidente, des essais de sous-clonage ont été réalisés au laboratoire avant mon arrivée sans succès.

Nous nous intéressons ici à l'interaction de la protéine Dock avec la protéine Elmo1. Des études ont montré que la zone d'interaction se situe dans la région N-terminale de Dock (résidus 1 à 177). Cette région comporte un domaine SH3 (résidus 1 à 66) et un domaine formé d'hélices  $\alpha$  (résidus 69 à 177).

Nous avons donc décidé de produire uniquement la région N-terminale de la protéine Dock dans le but d'étudier leur interaction avec Elmo1. Deux fragments sont étudiés, le premier ne comprend que le domaine SH3 (résidus 1 à 66) et le deuxième contient à la fois ce domaine SH3 et la région en hélices  $\alpha$  adjacente (résidus 1 à 177).

### ***1) Le domaine SH3***

Le protocole de production de la protéine SH3<sub>1</sub> (résidus 1-66) a été mis en place avant mon arrivée au laboratoire par Jean-Philippe Kleman et Isabel Ayala. Le même protocole a été utilisé pour produire la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA pour laquelle nous avons inséré une étiquette de biotinylation qui servira lors des études d'interaction par SPR. La production de la protéine GST-SH3<sub>1</sub> a elle aussi déjà été mise en place avant mon arrivée au laboratoire.

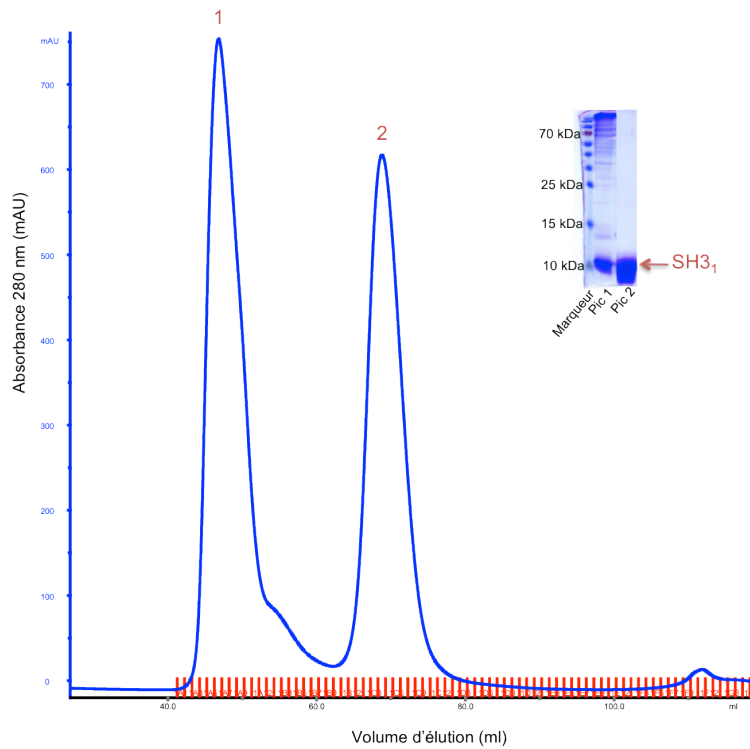
#### ***(a) Insertion d'une étiquette de biotinylation***

De la même manière que pour les fragments de Elmo1, une étiquette de biotinylation est insérée par mutagenèse dirigée (en page 93) à l'extrémité C-terminale de la protéine SH3<sub>1</sub> donnant ainsi lieu à la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA.

#### ***(b) Expression et purification***

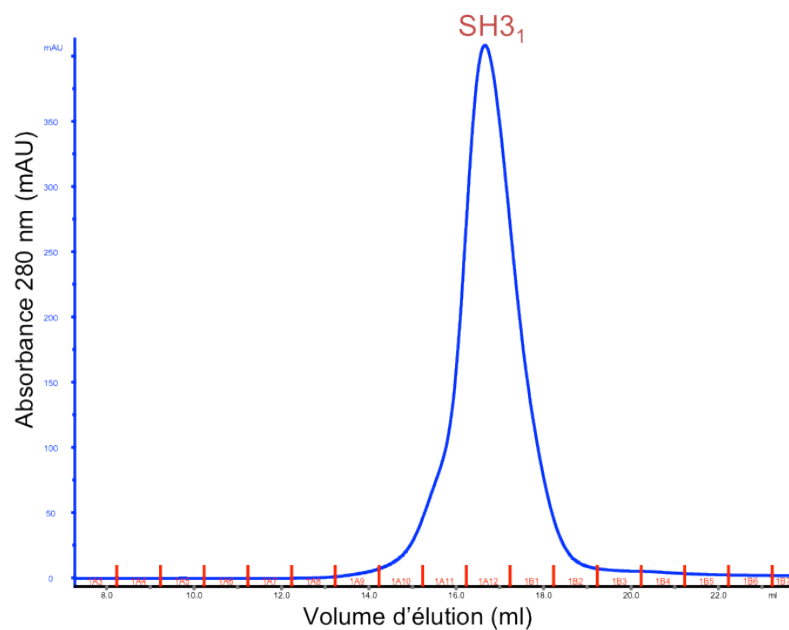
##### ***(i) SH3<sub>1</sub> et SH3<sub>1</sub>-BirA***

Après transformation de la souche d'expression *E.coli* BL21(DE3) par le plasmide pET28a-SH3<sub>1</sub>, les bactéries sont cultivées pour permettre la surexpression de la protéine SH3<sub>1</sub>. La protéine est produite sous forme de corps d'inclusion et se retrouve dans la fraction non soluble du lysat cellulaire centrifugé. Après lavage de ces corps d'inclusion, la protéine est solubilisée dans un tampon urée et purifiée par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 53).



**Figure 53 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3<sub>1</sub> en conditions dénaturantes (6 M urée). La protéine SH3<sub>1</sub> est éluée pure dans le deuxième pic. Colonne superdex 75 16/60.**

Une renaturation par dialyse permet ensuite à la protéine de retrouver sa structure tertiaire. Une nouvelle chromatographie d'exclusion de taille est alors réalisée pour séparer les agrégats (Figure 54). L'échantillon protéique est pur, sous forme de monomère.



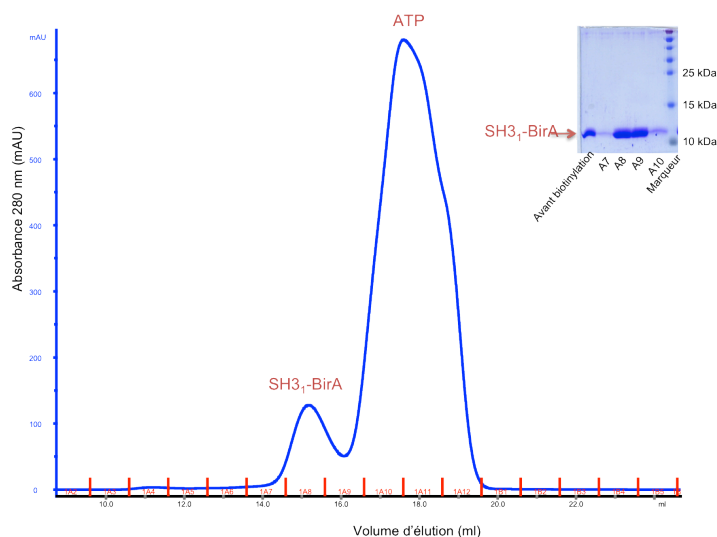
**Figure 54 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3<sub>1</sub>. Colonne superdex 75 10/300.**



### (c) Biotinylation

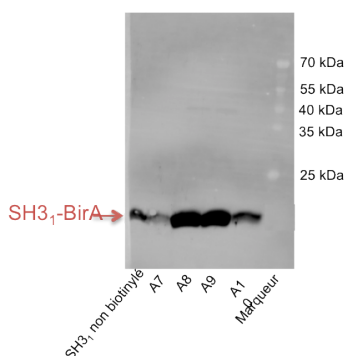
Une fois la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA produite il est nécessaire de biotinyler son étiquette pour qu'elle puisse être immobilisée sur une surface de streptavidine lors des expériences de SPR. La réaction de biotinylation est réalisée par l'enzyme BirA dans les conditions expérimentales décrites en page 106, suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille qui permet de séparer la protéine d'intérêt de l'enzyme, mais aussi de changer de tampon (Figure 55).

Afin de s'assurer que la protéine ait bien été biotinylée, un test de révélation de la biotinylation est effectué avec l'aide de Philippe Mas. Un Western Blot est réalisé, la révélation se fait par mesure de la fluorescence grâce à de la streptavidine couplée à un marqueur fluorescent Alexa (Figure 56).



**Figure 55 : Chromatographie d'affinité de SH3<sub>1</sub>-BirA biotinylé.**

Le pic majoritaire correspond à l'absorbance de l'ATP présent dans le tampon de biotinylation. La protéine SH3<sub>1</sub>-BirA biotinylée se retrouve dans le premier pic minoritaire pure. Colonne superdex 75 10/300.



**Figure 56 : Révélation par fluorescence à 488 nm du Western Blot de SH3<sub>1</sub>-BirA biotinylé.**

La protéine SH3<sub>1</sub>-BirA montre une forte fluorescence, ce qui prouve qu'elle a bien été biotinylée lors de la réaction avec l'enzyme BirA. Nous pouvons aussi remarquer que la protéine n'ayant pas subi de réaction de biotinylation montre tout de même un peu de fluorescence ce qui pourrait témoigner d'une biotinylation naturelle dans la bactérie lors de sa production, d'une coloration non spécifique ou d'une interaction non spécifique avec la streptavidine utilisée pour révéler la protéine.

### (i) GST-SH3<sub>1</sub>

Après transformation de la souche d'expression *E.coli* BL21(DE3) par le plasmide pGEX-TEV-SH3<sub>1</sub>, les bactéries sont cultivées pour permettre la surexpression de la protéine GST-SH3<sub>1</sub>. Contrairement à la protéine SH3<sub>1</sub>, la protéine GST-SH3<sub>1</sub> est produite de façon soluble. Le lysat bactérien est déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité au glutathion, la protéine est ensuite éluée, mais se retrouve mélangée avec des protéines GST libres contaminantes (Figure 57). La présence de GST libre peut témoigner d'une surexpression dans la bactérie de la forme libre ou d'un clivage de cette étiquette lors l'expression ou de la lyse bactérienne. Une chromatographie d'exclusion de taille permet ensuite de séparer cette GST libre de la GST-SH3<sub>1</sub>.

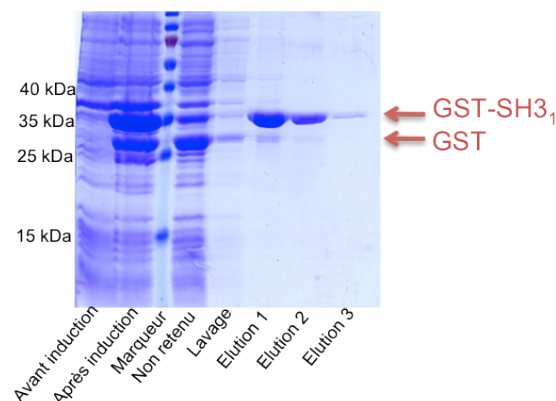


Figure 57 : Analyse par SDS-PAGE de la purification de GST-SH3<sub>1</sub> par chromatographie d'affinité.

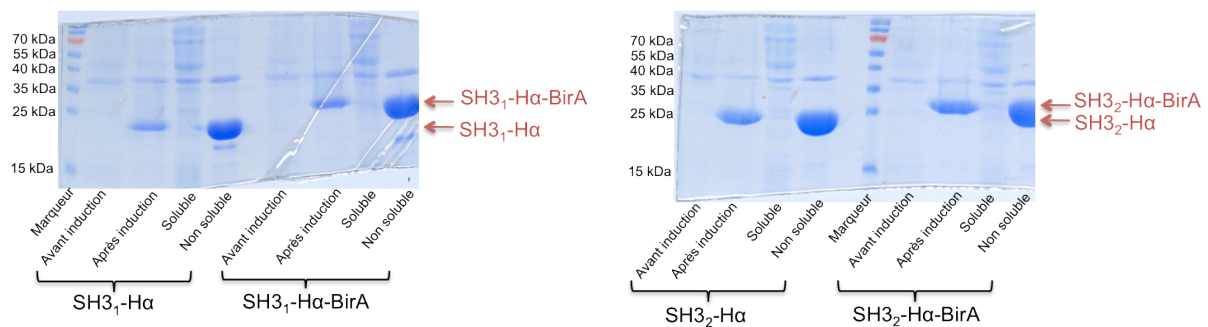
## 2) Le domaine SH3-H $\alpha$

Le gène codant pour le fragment SH3-H $\alpha$  (résidus 1-177) avec et sans étiquette de biotinylation des protéines Dock1 et Dock2 a été synthétisé et inséré dans le vecteur pet28a.

### (a) *Souche E.coli* BL21(DE3)

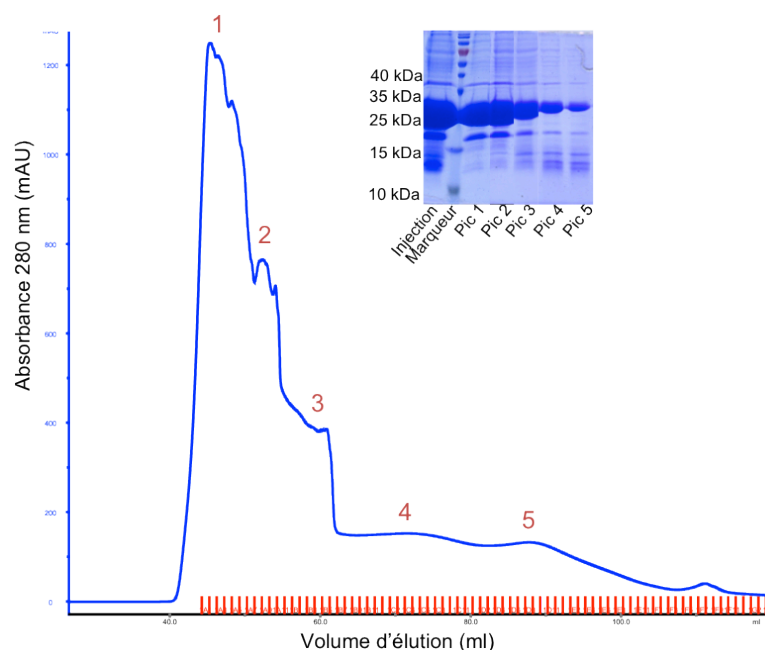
Les premiers tests d'expressions dans la souche *E.coli* BL21(DE3) des fragments SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$ , SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ -BirA et SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$ -BirA à différentes températures d'induction

(18°C, 30°C et 37°C) montrent que les protéines s'expriment en très grande quantité quelle que soit la condition de température utilisée, mais se trouvent toujours dans la fraction non soluble du lysat cellulaire après centrifugation (Figure 58). Ces fragments semblent donc se comporter de la même manière que le domaine SH3<sub>1</sub> lors de son expression, ils sont produits sous forme de corps d'inclusion.



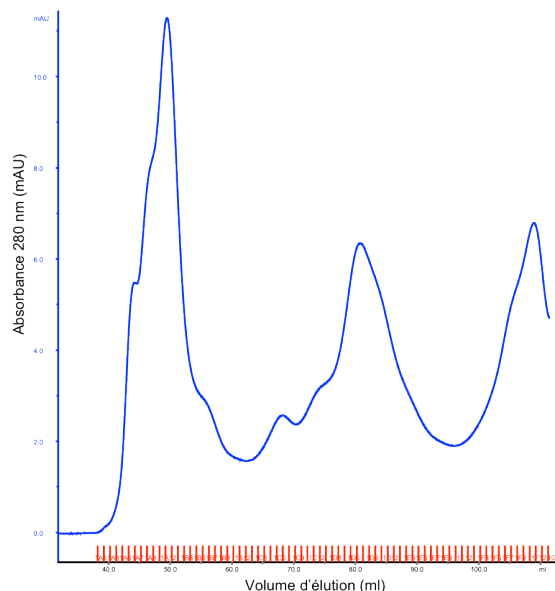
**Figure 58 : Analyse SDS-PAGE des tests d'expressions des fragments SH3-Ha.**  
**Pour les 4 constructions, la protéine est exprimée mais de manière non soluble dans les bactéries.**

Nous avons donc dans un premier temps testé le même protocole de production et de purification que pour la protéine SH3<sub>1</sub>. Cependant le profil d'élution lors de la chromatographie d'exclusion de taille de la protéine solubilisée en urée montre uniquement la présence d'agrégats en présence de nombreux contaminants (Figure 59).



**Figure 59 : Chromatographie d'exclusion de taille SH3<sub>1</sub>-Ha en condition dénaturantes (urée 6M).**  
**SH3<sub>1</sub>-Ha est éluée sous forme d'agrégat avec de nombreux contaminants. Colonne superdex 75 16/60.**

Nous avons tout de même tenté de renaturer les différents fragments de Dock par le même protocole de dialyse que pour la protéine SH3<sub>1</sub>. Une grande partie des échantillons précipite lors de l'élimination de l'urée dans le tampon. La chromatographie d'exclusion de taille finale dans un tampon contenant 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl et 5% Glycérol ne révèle pas la présence des fragments SH3-H $\alpha$  solubles (Figure 60).



**Figure 60 : Chromatographie d'exclusion de taille SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  après renaturation.** La quantité de protéine qui s'élue est extrêmement faible, le nombre de pic montre qu'il y a encore beaucoup d'espèces présentes. Colonne superdex 75 16/60.

La région en hélice  $\alpha$  voisine du domaine SH3<sub>1</sub> semble augmenter l'insolubilité du domaine SH3 seul. D'après la structure de SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$  en complexe avec un fragment de Elmo1 code pdb 3A98, ces hélices  $\alpha$  présentent en effet des régions hydrophobes impliquées dans l'interaction avec la protéine Elmo1.

### **(b) Souche *E.coli* SoluBL21**

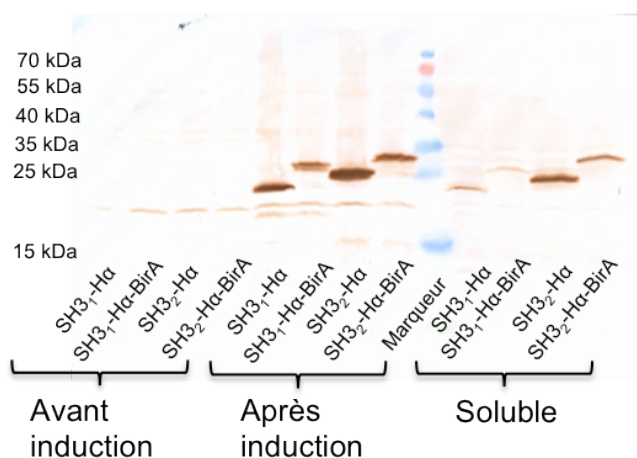
#### **(i) Tests d'expression**

La souche bactérienne *E.coli* SoluBL21 commerciale est supposée favoriser la solubilisation des protéines habituellement très peu ou non solubles. Nous avons donc testé l'expression des différents fragments SH3-H $\alpha$  dans cette souche bactérienne en suivant le protocole fourni par le fournisseur (la culture bactérienne se fait en milieu minimum M9). L'analyse par SDS-PAGE des fractions solubles et non solubles du lysat cellulaire après centrifugation semble montrer la présence de ces fragments uniquement dans la fraction non soluble. Un Western Blot est ainsi réalisé à partir de ces SDS-PAGE pour obtenir une révélation plus sensible avec un anticorps anti-histidine qui reconnaît l'étiquette histidine de

ces fragments SH3-H $\alpha$  (Figure 61).

Contrairement à l'expression dans la souche *E.coli* BL21(DE3), une faible quantité des protéines SH3-H $\alpha$  exprimées se retrouve dans la fraction soluble. Nous avons donc utilisé cette souche bactérienne pour tenter de produire les fragments SH3-H $\alpha$  sous forme soluble.

Dans un premier temps, des tests de purification sur résine de Nickel sont réalisés à partir de cultures bactériennes où les fragments SH3-H $\alpha$  sont surexprimés. Après analyse par SDS-PAGE et Western Blot, nous pouvons observer qu'une faible quantité de protéine soluble s'est fixé à la colonne d'affinité est éluée correctement.

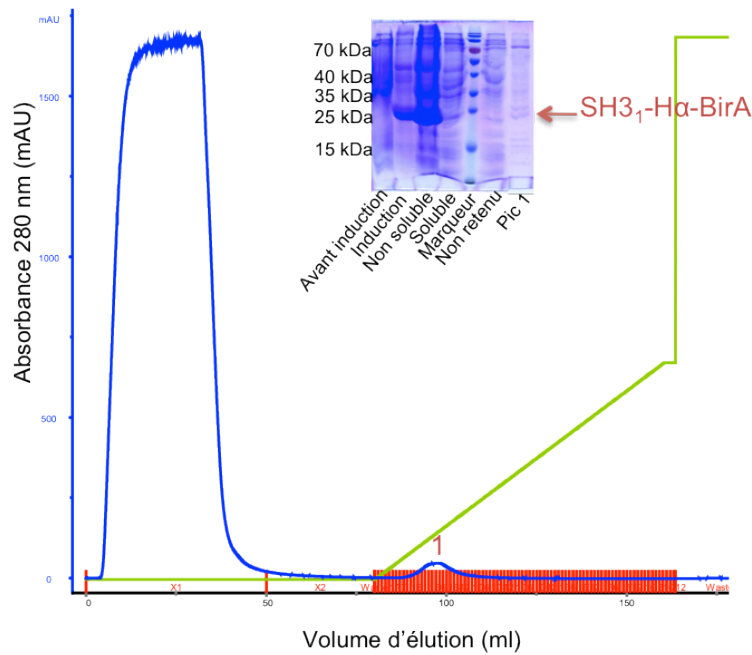


**Figure 61 : Western Blot des tests d'expression et de solubilité des fragments SH3-H $\alpha$ .**

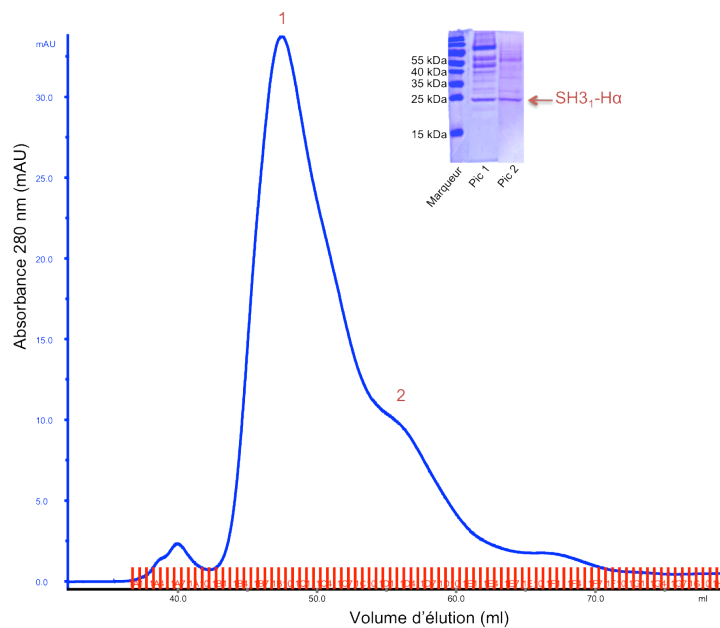
## (ii) Production en grand volume

Des essais de production en grand volumes les 4 fragments SH3-H $\alpha$  sont donc mis en place pour tenter d'obtenir une quantité de protéine suffisante pour pouvoir mener des études d'interaction avec la protéine Elmo1. La chromatographie d'affinité au Nickel montre que seul le fragment SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ -BirA est présent lors de l'élution de la colonne. Toutefois, la quantité de protéine est très faible (environ 1,2 mg) et l'échantillon est contaminé par d'autres protéines (Figure 62).

Les fractions d'élution sont regroupées, concentrées et injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille pour tenter de séparer les contaminants et les agrégats. Le profil d'élution de cette purification montre que la protéine est éluée sous forme d'agrégats avec de nombreux contaminants (Figure 63). Nous n'avons donc pas réussi à obtenir la protéine pure.



**Figure 62 : Chromatographie d'affinité au Nickel de SH3<sub>1</sub>-Hα-BirA.**  
 Une très faible quantité de SH3<sub>1</sub>-Hα-BirA seulement est visible par SDS-PAGE. Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole.



**Figure 63 : Chromatographie d'exclusion de taille de SH3<sub>1</sub>-Hα-BirA.**  
 Très peu de protéine est éluée et de nombreux contaminants sont présents. Colonne superdex 75 16/60.

En parallèle, nous avons tenté de purifier les fragments sous forme de corps d'inclusion issus de la souche *E.coli* SoluBL21 par le même protocole que pour la protéine SH3<sub>1</sub>. Mais comme lors de l'expression dans les bactéries *E.coli* BL21 DE3, nous n'avons pas réussi à solubiliser les différents fragments SH3<sub>1</sub>-Hα.

La production du domaine SH3<sub>1</sub> avec et sans étiquette de biotinylation permet d'obtenir de très grandes quantités de protéine pure. Par contre nous n'avons pas réussi à produire le fragment SH3-H $\alpha$  de Dock1 et de Dock2 avec ou sans étiquette de biotinylation. Toutes nos tentatives de solubilisation de ces fragments exprimés de façon non soluble ont échouées.

## C . Production des complexes Elmo1/SH3-H $\alpha$

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, il n'a pas été possible de produire les fragments SH3-H $\alpha$  de Dock. Les travaux de Hanawa-Suetsugu publiés récemment (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012), décrivent le protocole d'obtention de la structure du complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$ . Le complexe a été produit par système d'expression *in vitro* « cell-free » en co-exprimant les deux fragments. Nous avons donc adapté cette approche de production de complexe à l'expression en bactéries.

### 1) *Expression et purification*

#### (a) *Expression*

Des souches bactériennes *E.coli* BL21(DE3) sont transformées simultanément par le plasmide d'un fragment de Elmo1 et par le plasmide d'un fragment SH3-H $\alpha$  de Dock1 ou de Dock2. Les différentes combinaisons de complexes Elmo1/Dock testées sont résumées dans le Tableau XXV. Les plasmides des fragments de Elmo1 et de Dock ne sont pas résistants aux mêmes antibiotiques, ce qui permet de sélectionner uniquement les colonies résistantes aux deux antibiotiques à la fois et donc ayant intégré les deux plasmides.

	1	2	3	4	5	6
<b>Elmo1</b>	ElmoWT	ElmoWT	Elmo $\Delta$ PxxP	Elmo $\Delta$ N	Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP	ElmoN
<b>Dock</b>	SH3 <sub>2</sub> -H $\alpha$	SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$	SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$	SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$	SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$	SH3 <sub>1</sub> -H $\alpha$

**Tableau XXV : Récapitulatif des complexes Elmo1/Dock co-transformés en bactérie *E.coli* BL21(DE3).**

Toutes les co-transformations testées ont permis d'obtenir des colonies. Des tests d'expressions sont alors réalisés. La lyse bactérienne est réalisée de manière chimique avec une solution de BugBuster. De façon surprenante, l'analyse par SDS-PAGE et Western Blot a permis de révéler la présence des deux fragments de Elmo1 et Dock dans la fraction soluble du lysat bactérien centrifugé pour tous les complexes. Ainsi, pour la première fois le fragment

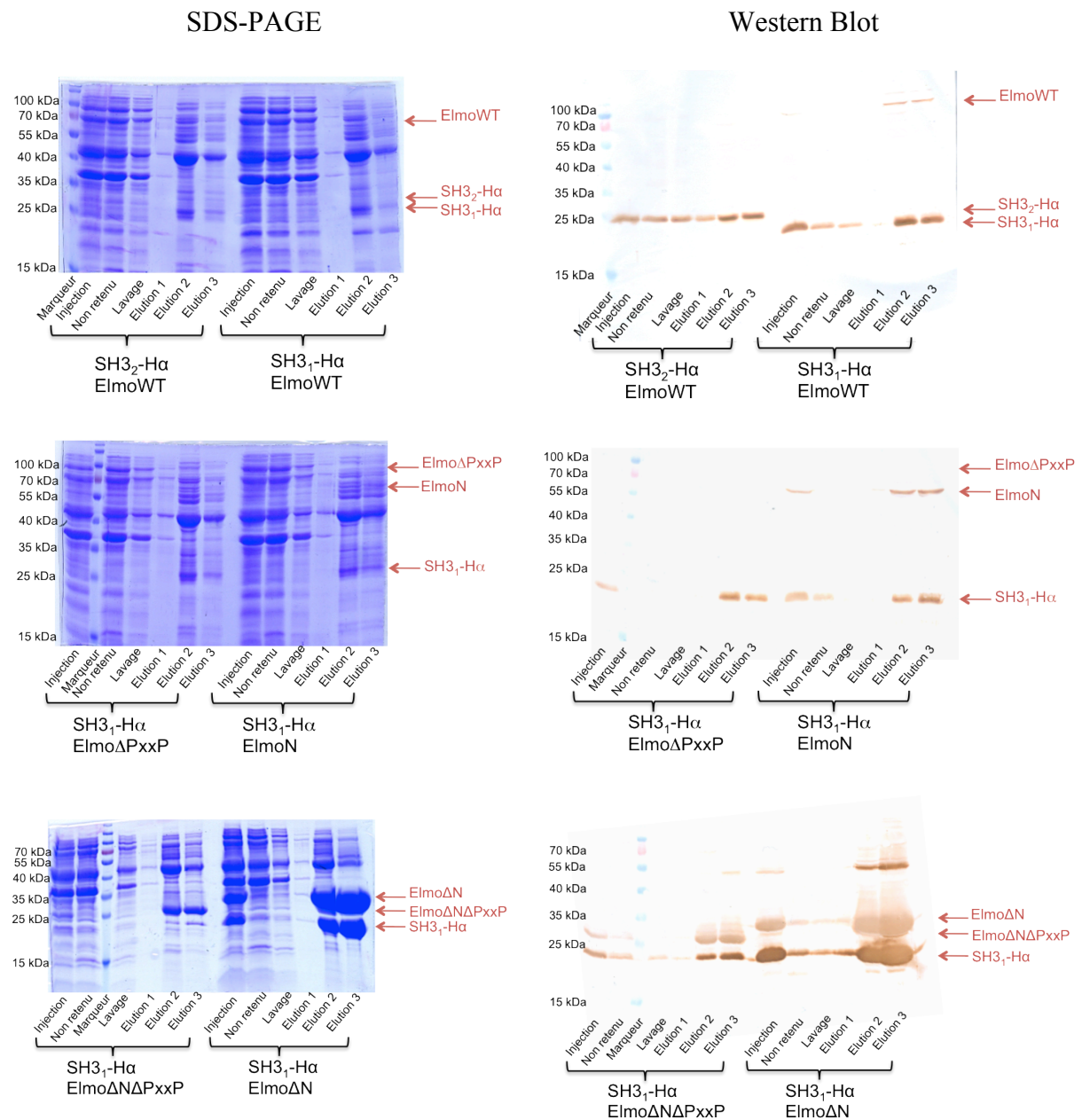
SH3-H $\alpha$  de Dock se retrouve soluble et en grande quantité. Cela laisse penser qu'il y a eu un effet du fragment de Elmo1 avec lequel il est co-exprimé qui lui a permis d'augmenter sa solubilité, un complexe Elmo1/Dock s'est peut-être formé. Cette hypothèse laisse supposer que le fragment ElmoN interagirait avec le fragment SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , alors que toutes les données bibliographiques décrivent l'inverse.

A partir des échantillons protéiques précédents, des tests de purification sont réalisés. La fraction soluble du lysat bactérien est injectée sur une colonne de chromatographie d'affinité au Nickel. L'élution se fait par paliers de concentration en imidazole (100 mM, 250 mM et 500 mM). L'analyse par SDS-PAGE et Western Blot de cette chromatographie est présentée dans la Figure 64.

Dans toutes les expériences nous avons réussi à purifier le fragment SH3-H $\alpha$  de façon soluble, nous pouvons voir que les fragments ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP ne sont parfois pas révélés par Western Blot avec l'anticorps anti-histidine. Nous avons pu remarquer que la protéine ElmoWT se dégrade au cours du temps après sa purification en perdant sa région N-terminale et donc son étiquette hexahistidine, il en est peut-être de même pour le fragment Elmo $\Delta$ PxxP. Ce qui pourrait expliquer que ces deux fragments n'ont pas été révélés par Western Blot. Pour les échantillons 2, 4, 5 et 6 (Tableau XXV), la présence et l'élution au même moment des fragments de Elmo1 et de Dock1 est bien visible.

Nous avons exprimé en grand volume les complexes 2, 4, 5 et 6 (Tableau XXV) afin de produire les protéines en grande quantité. Après une lyse bactérienne par sonication et centrifugation du lysat, la fraction soluble est injectée sur une colonne d'affinité au Nickel.

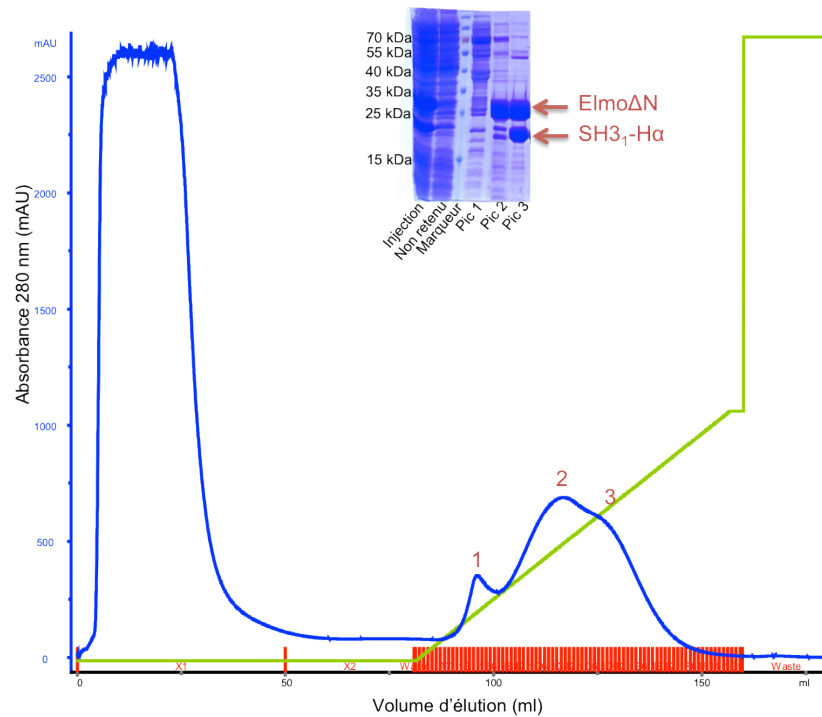




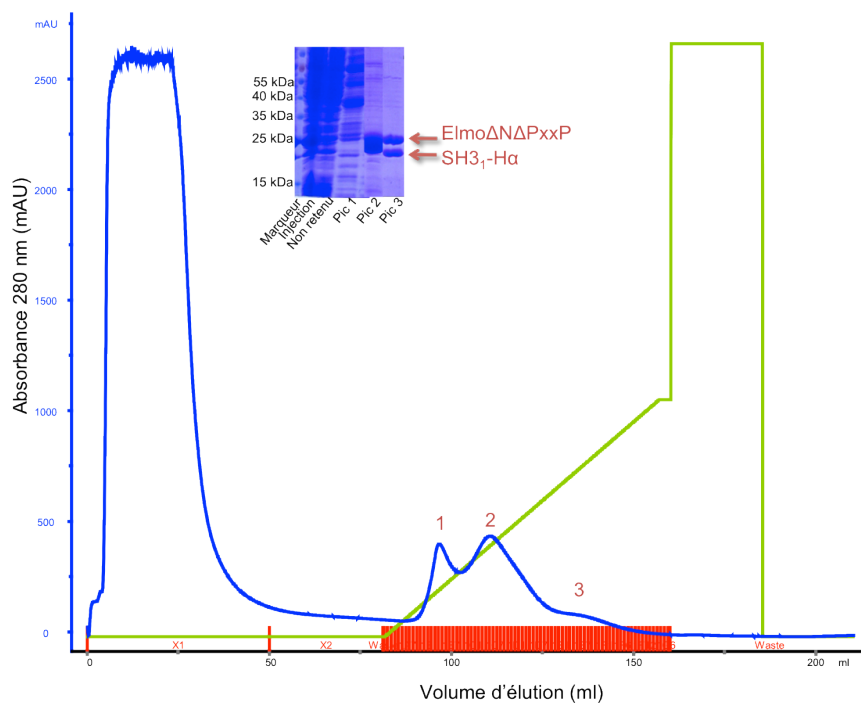
**Figure 64 : Analyse par SDS-PAGE (à gauche) et Western Blot des tests de purification des complexes Elmo1/SH3-Ha.**

### (b) Chromatographie d'affinité

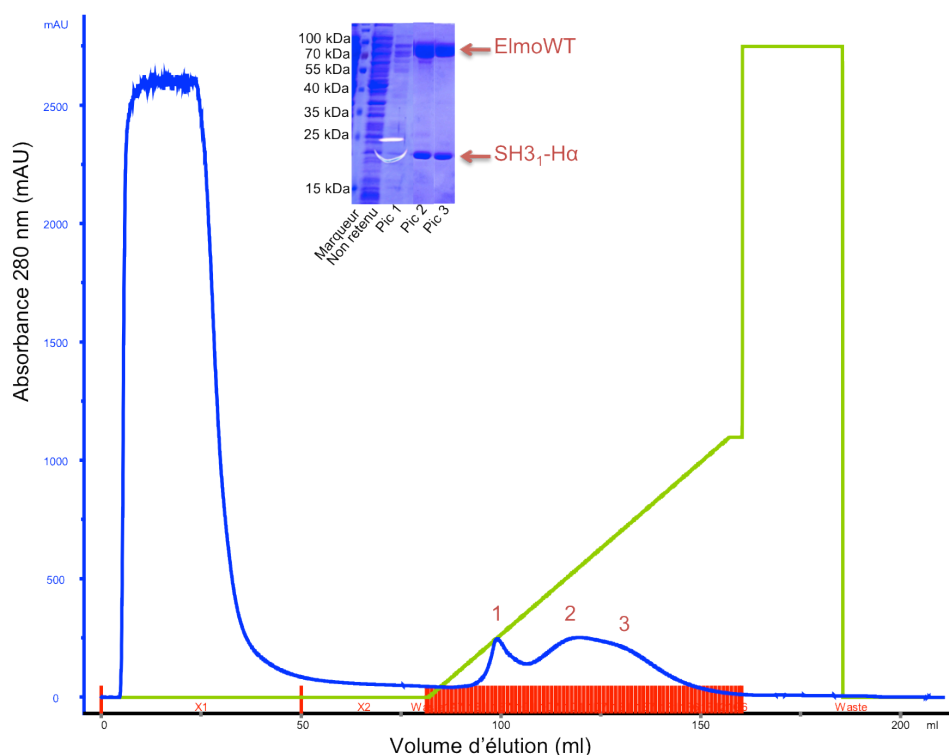
Les fragments de Elmo1 et de Dock1 utilisés possèdent tous une étiquette hexahistidine qui permet de purifier ces protéines. Pour les complexes 2, 4 et 5 (Tableau XXV), le profil d'élution de la chromatographie montre, en plus du pic des protéines ayant des interactions non spécifiques avec la résine (pic 1), un double pic d'élution (pics 2 et 3) qui laisse penser que chaque protéine est éluée à une concentration en imidazole différente (Figure 65, Figure 66 et Figure 67). L'analyse par SDS-PAGE montre que les deux protéines Elmo1 et Dock1 se retrouvent sous les pics 2 et 3.



**Figure 65 : Chromatographie d'affinité au Nickel complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .**  
Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole. Pic1 : protéines ayant des interactions non spécifiques avec la résine. Pic 2 : Elmo $\Delta$ N seul. Pic 3 : Elmo $\Delta$ N et SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .

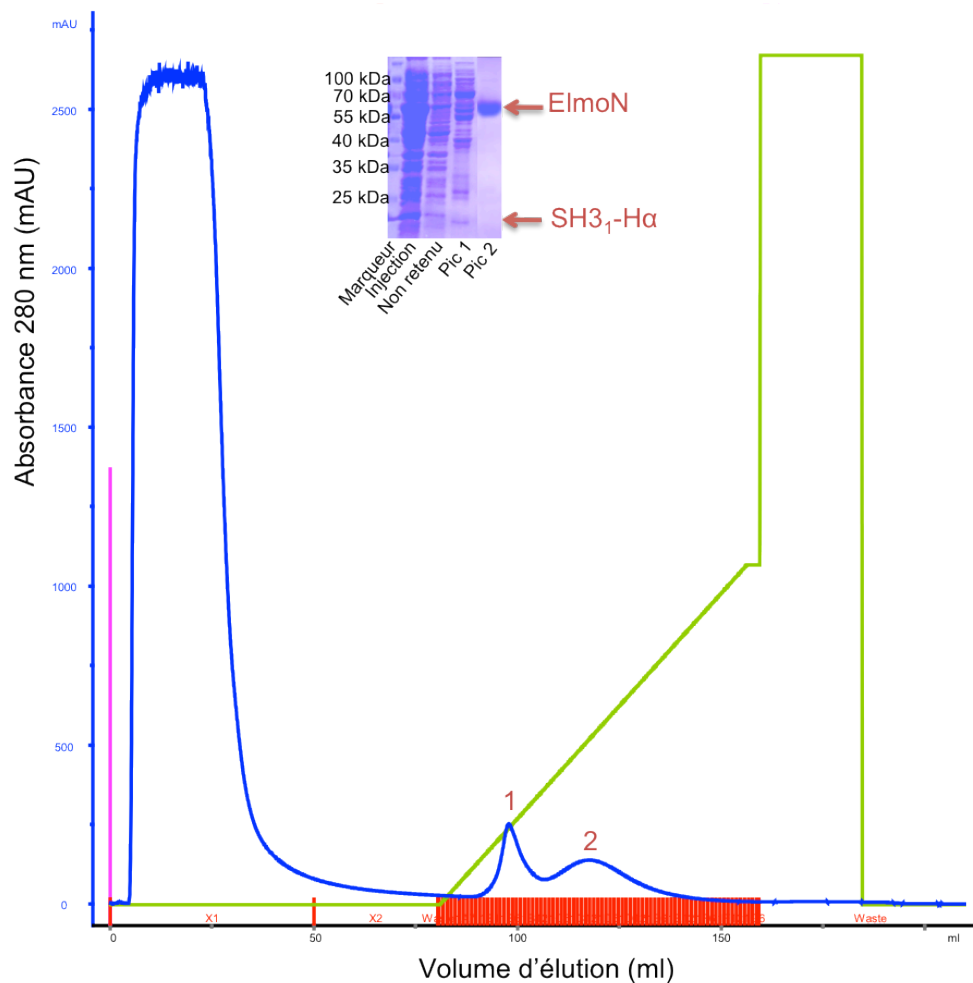


**Figure 66 : Chromatographie d'affinité au Nickel complexe Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .**  
Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole. Pic1 : protéines ayant des interactions non spécifiques avec la résine. Pic 2 : Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP seul. Pic 3 : Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP et SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .



**Figure 67 : Chromatographie d'affinité au Nickel complexe ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-Hα.** Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole . Pic1 : protéines ayant des interactions non spécifiques avec la résine. Pic 2 : ElmoWT seul. Pic 3 : ElmoWT et SH3<sub>1</sub>-Hα.

Contrairement aux chromatographies précédentes, la chromatographie avec les fragments ElmoN et SH3<sub>1</sub>-Hα ne montre pas de troisième pic (Figure 68). L'analyse par SDS-PAGE révèle en effet qu'il n'y a que le fragment de ElmoN produit de façon soluble. Le fragment SH3<sub>1</sub>-Hα qui était soluble lors de nos tests d'expression en petit volume en co-expression avec ElmoN, ne l'est plus ici. Une différence majeure entre ces deux protocoles réside dans la technique de lyse bactérienne. Lors des tests d'expression, la lyse est effectuée de manière chimique avec une solution de Bug Buster qui contient notamment de nombreux détergents. Alors que pour les expressions en grand volume, la lyse est réalisée par sonication sans détergents. La présence de ces détergents a peut-être aidé le fragment SH3<sub>1</sub>-Hα à se solubiliser, mais nous ne pouvons pas savoir s'il a réellement formé un complexe avec ElmoN.



**Figure 68 : Chromatogramme d'affinité au Nickel complexe ElmoN/SH3<sub>1</sub>-Hα.**  
Colonne NiNTA 5 ml (QIAGEN), élution par un gradient de 0 à 40% de tampon contenant 0,5 M imidazole.

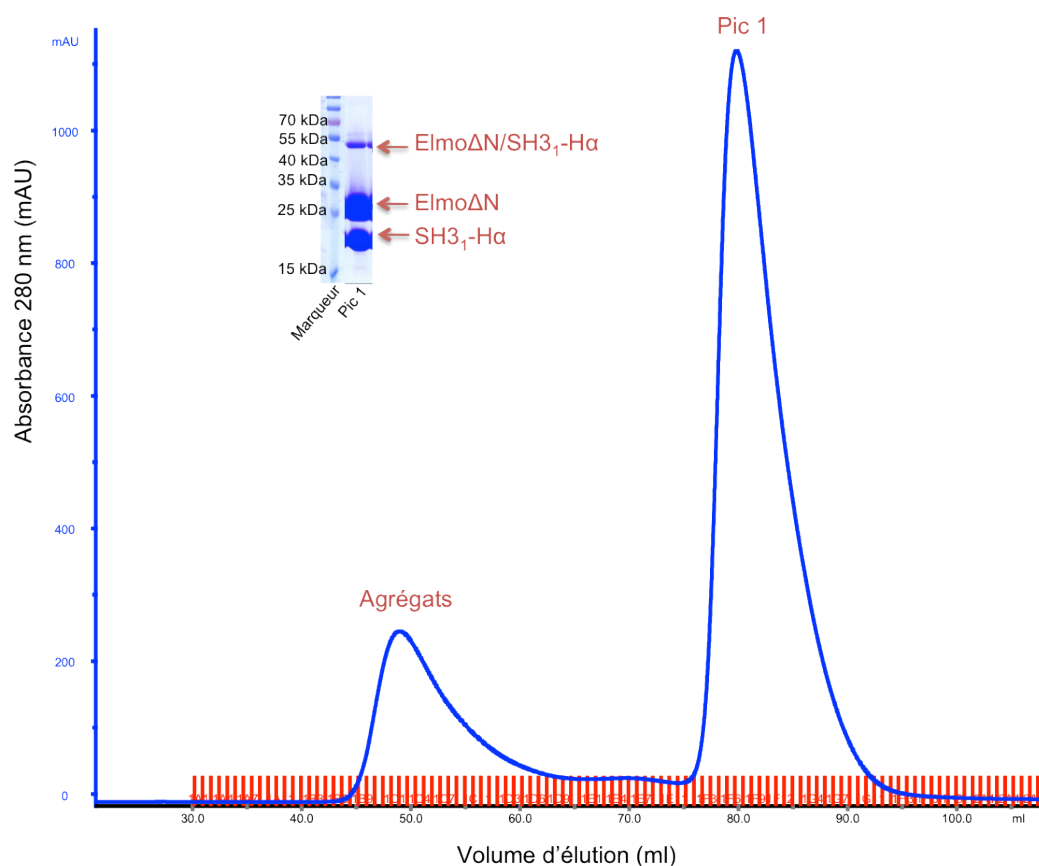
### ***(c) Mise en évidence des complexes Elmo1/SH3-Hα***

Les fractions de chaque chromatographie d'affinité correspondant aux protéines Elmo1 et Dock1 sont regroupées puis injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille. La séparation des protéines selon leur poids moléculaire devrait permettre de savoir si les protéines sont libres ou en complexes en solution. Pour confirmer la présence des complexes, des expériences de SEC-MALLS ont été réalisées.

#### ***(i) ElmoΔN/ SH3<sub>1</sub>-Hα***

Le profil d'élution des protéines ElmoΔN et SH3<sub>1</sub>-Hα montre un pic d'élution contenant les deux protéines, qui semble en accord avec le volume d'élution d'un complexe d'après la calibration de la colonne (Figure 69). Cependant, les deux protéines ont un poids moléculaire assez proche, il est possible qu'elles soient éluées pour un même volume sans pour autant former de complexe. Nous avons réalisé un gel d'acrylamide en conditions non

réductrices, et une bande pour un poids moléculaire d'environ 50 kDa apparaît. Le complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  a un poids moléculaire théorique de 49 kDa, ce qui correspond tout à fait à cette bande.



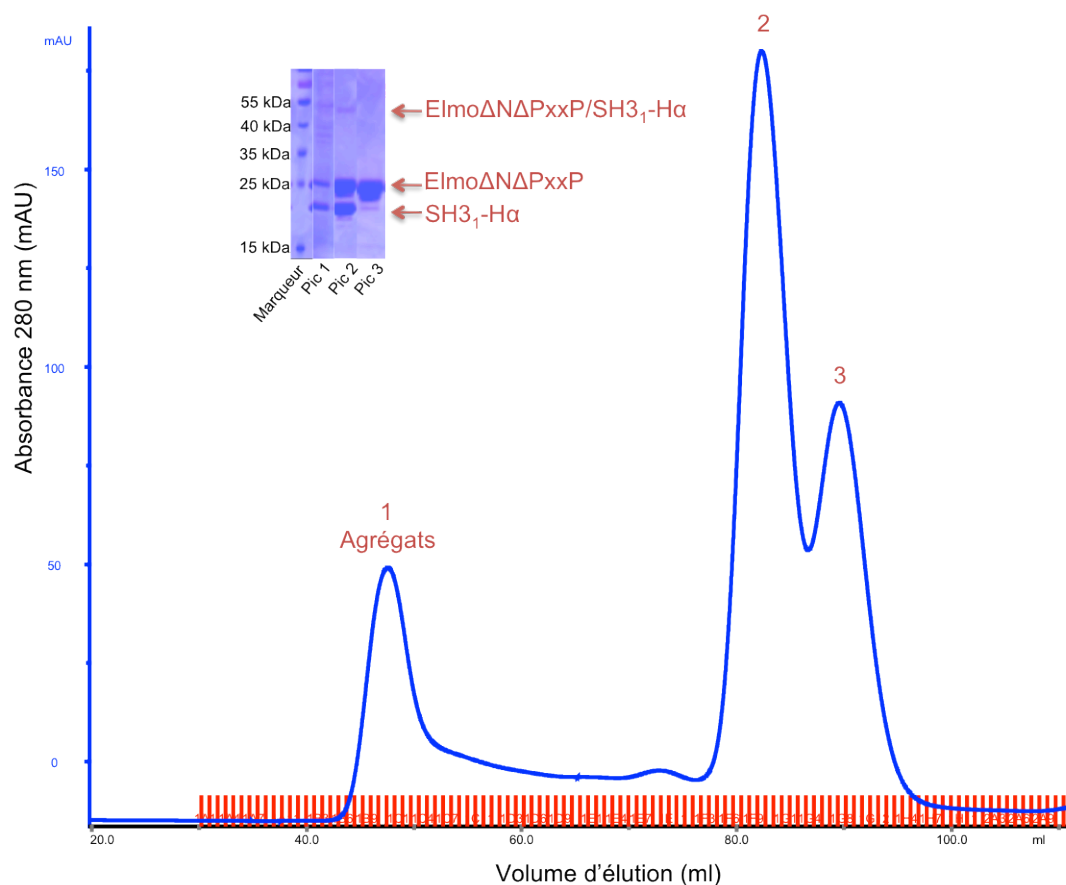
**Figure 69 : Chromatographie d'exclusion de taille de Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .**  
Le SDS-PAGE en conditions non réductrices permet de visualiser une bande correspondant au complexe.

Pour vérifier la présence du complexe, nous avons réalisé une expérience de SEC-MALLS avec l'aide de Julien Perard. L'échantillon protéique est homogène, une seule espèce de 49,6 kDa est mise en évidence, ce qui prouve la formation du complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .

## (ii) Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/ SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$

Le profil d'élution de ces protéines montre deux pics d'élution qui se chevauchent, l'hypothèse d'un complexe semble compromise (Figure 70). Cependant, le volume d'élution du premier pic semble en accord avec la présence d'un complexe d'après la calibration de la colonne. En analysant le résultat d'un SDS-PAGE en conditions non réductrices, nous pouvons nous apercevoir que le premier pic d'élution contient bien les deux fragments et le second, uniquement le fragment Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP. Le complexe Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  a un

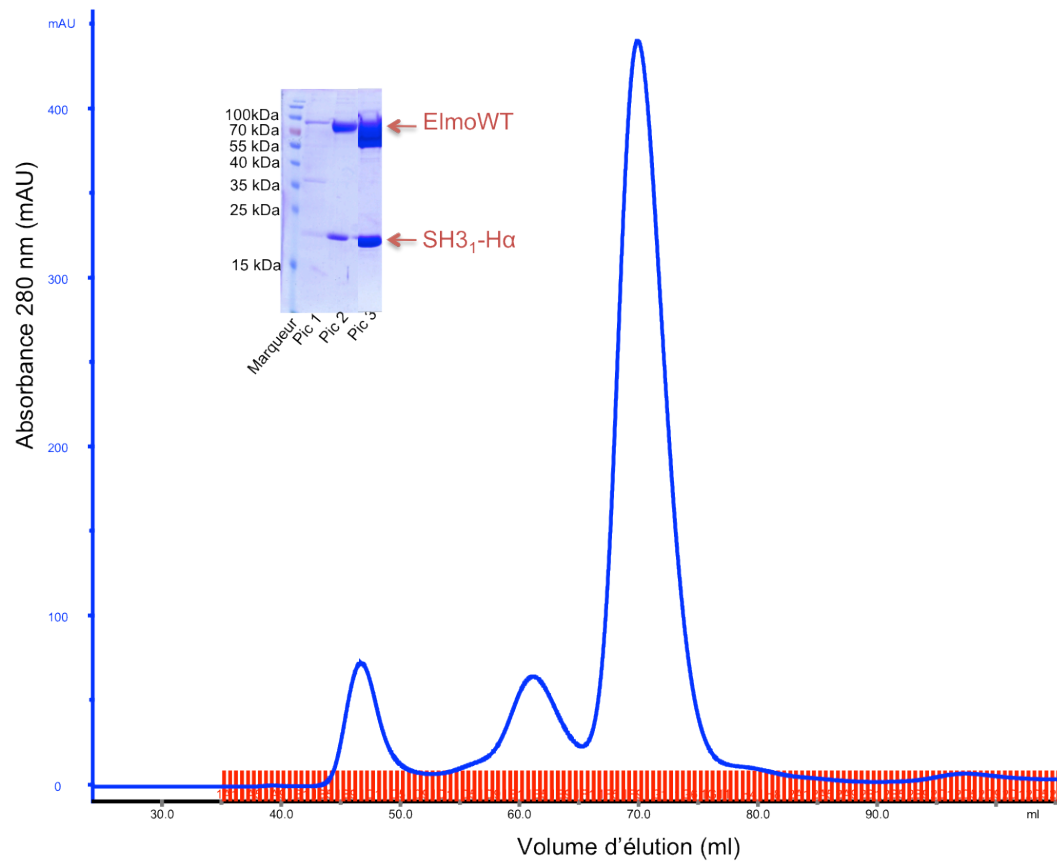
poids moléculaire théorique de 47 kDa, une bande à un poids moléculaire d'environ 50 kDa est aussi retrouvée dans le premier pic. Nous pouvons donc penser, que comme dans le cas du fragment Elmo $\Delta$ N, le fragment Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP a formé un complexe avec le fragment SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , avec la différence qu'ici une partie des fragments Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP se trouvent sous forme libre.



**Figure 70 : Chromatographie d'exclusion de taille de Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .**  
Le SDS-PAGE en conditions non réductrices permet de visualiser une bande correspondant au complexe.  
Colonne superdex 75 16/60.

### (iii) ElmoWT/ SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$

De la même manière que précédemment, nous pouvons observer sur le profil d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille de l'échantillon ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , deux pics qui après analyse par SDS-PAGE en condition non réductrices révèlent tous les deux la présence des deux fragments (Figure 71). Le pic de plus haut poids moléculaire fait penser à une dimérisation ElmoWT. La superposition avec une courbe d'élution d'une protéine ElmoWT seule montre un décalage des deux pics dans le sens d'une augmentation de poids moléculaire. Ces deux pics semblent donc montrer la présence de complexes ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  sous forme de monomère mais aussi de dimère.



**Figure 71 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ .  
Colonne superdex 75 16/60**

Il n'est pas possible de savoir si une partie des fragments ElmoWT sous le pic d'élution sont sous forme libre, le décalage du volume d'élution est trop faible pour les séparer de manière certaine. Nous avons tenté de séparer les possibles formes de ElmoWT libres de celles en complexes par colonne échangeuse d'anion, mais un seul pic d'élution est là aussi révélé.

Les étiquettes hexahistidine des deux fragments ne sont pas clivables avec la même protéase (TEV pour ElmoWT et Thrombine pour SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ ). La suppression de l'étiquette du fragment ElmoWT devrait permettre de ne purifier plus que la protéine en complexe avec le fragment de Dock sur une colonne d'affinité. Malheureusement, après un essai de digestion à la protéase TEV, toute la protéine a précipité.

Une expérience de SEC-MALLS a finalement permis de montrer que toute la protéine ElmoWT se trouve sous forme de complexe avec un poids moléculaire calculé de 109 kDa très proche de celui théorique de 110 kDa.

Grâce à la co-expression des fragments de Elmo1 et de Dock, nous avons pu produire les complexes ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-Hα, ElmoΔN/SH3<sub>1</sub>-Hα et ElmoΔNΔPxxP/SH3<sub>1</sub>-Hα. Le fragment SH3<sub>1</sub>-Hα qui était jusqu'à présent insoluble, est ici produit de façon soluble et en grande quantité. Nous pouvons remarquer toutefois qu'il n'est retrouvé que sous forme de complexe, l'interaction avec Elmo1 est donc nécessaire à sa stabilité. Lors des tests d'expression, la production du fragment SH3<sub>1</sub>-Hα de façon soluble avec le fragment ElmoN a été mise en évidence, alors que ce fragment de Elmo1 n'est pas connu pour interagir avec Dock1. La présence de détergents dans le tampon de lyse a certainement un rôle dans cette solubilisation que nous avons pas réussi à obtenir lors des productions en plus grand volume sans détergent. Il serait intéressant d'essayer une lyse cellulaire en présence de détergents en grand volume pour produire ce fragment de Dock1 en présence ElmoN. Cela permettrait de savoir si ces deux fragments sont réellement produits en complexes ou seulement libres. La production du fragment SH3<sub>1</sub>-Hα seul n'a pas été testée en présence de détergents, cela pourrait aboutir à la solubilisation de ce fragment pour permettre des études d'interaction avec les différents fragments de Dock.



## II . Etude de l'interaction de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock1

Pour déterminer la contribution précise de la région C-terminale de Elmo1 dans la formation du complexe avec le domaine SH3 de Dock1 nous avons réalisé différentes expériences, notamment en utilisant des techniques de RMN (en collaboration avec Pierre Gans) et de SPR. Une partie du travail présenté dans cette partie a fait l'objet d'une publication (Sevajol, Reiser et al. 2012).

### A . Essais de mise en évidence de complexes

#### 1) *Co-précipitation*

Avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs expériences de co-précipitation ont été réalisées par Anne Chouquet et Jean-Baptiste Reiser dans le but d'étudier l'interaction de la protéine ElmoWT avec le domaine SH3 de la protéine Dock1. Les expériences n'ont pas permis de mettre en évidence de complexe ElmoWT/ SH3<sub>1</sub>. Des problèmes d'interaction non spécifique de ElmoWT sur les différentes résines ont été mis en évidence.

Nous avons par la suite tenté une nouvelle expérience de co-précipitation selon le même protocole pour étudier le complexe ElmoΔN/SH3<sub>1</sub>. La protéine GST-SH3<sub>1</sub> est donc capturée sur une résine et nous observons l'interaction de ElmoΔN sur celle-ci. L'analyse par SDS-PAGE montre que ElmoΔN se fixe de manière non spécifique sur la résine (Puit 3 témoin ElmoΔN), par contre, nous n'observons pas de formation de complexe (Figure 72).

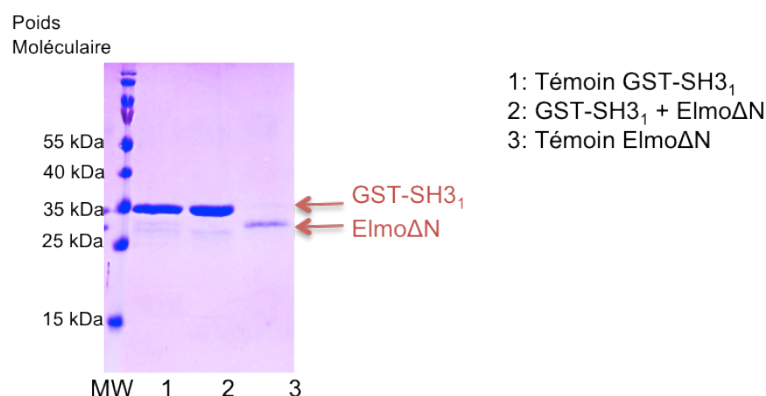


Figure 72 : Analyse SDS-PAGE de la co-précipitation GST-SH3<sub>1</sub>/ElmoΔN.

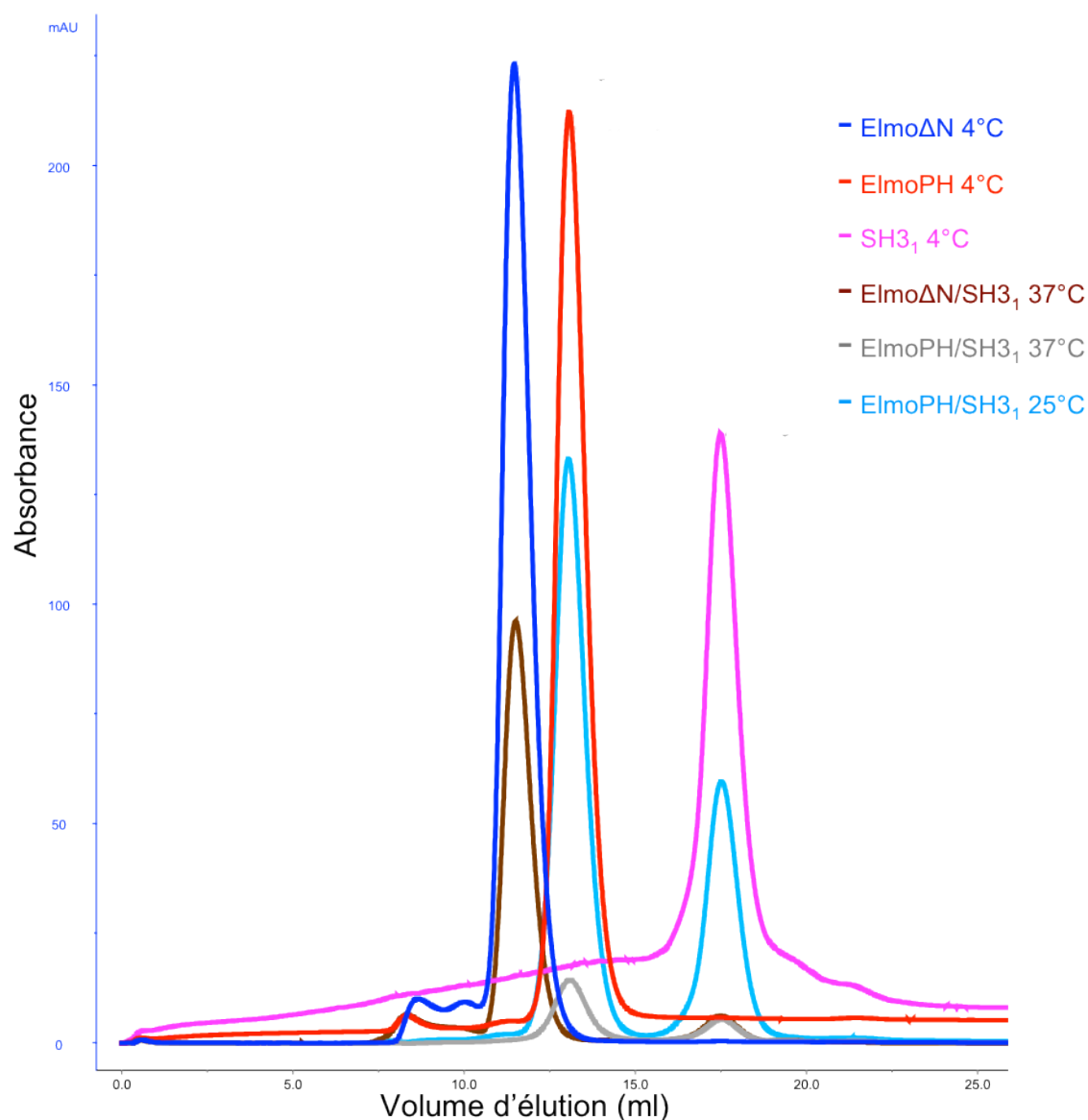
## ***2) Un complexe instable***

Afin d'observer les complexes formés par les fragments courts de Elmo1 (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH) avec le domaine SH3<sub>1</sub> nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion de taille. Le volume d'élution des protéines dépend de leur masse apparente. La comparaison des profils d'élution d'un échantillon de protéine seule ou en complexe devrait montrer une modification du volume d'élution, signifiant la formation du complexe. Nous n'avons pas utilisé les fragments longs de Elmo1 (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP), car l'augmentation de la masse moléculaire liée à la formation du complexe avec la protéine SH3<sub>1</sub> ne serait pas assez importante pour être observée lors de la chromatographie d'exclusion de taille, une analyse par SEC-MALLS serait pour ces fragments plus appropriée.

Plusieurs échantillons protéiques sont préparés pour tenter de former des complexes. Des mélanges équimolaires des fragments de Elmo1 et de la protéine SH3<sub>1</sub> à 200  $\mu$ M sont incubés dans des conditions variables : 6 heures à 37°C et 24h à 25°C.

Après 6 heures d'incubation, les deux échantillons du mélange ElmoPH/SH3<sub>1</sub> (à 25°C et 37°C), montrent une importante précipitation. L'échantillon du mélange Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub> à 37°C a lui aussi précipité au bout de 6 heures mais de façon moins importante. Par contre, à 25°C il n'y a pas de signe de précipitation au bout de 6 heures, et seulement de légères traces au bout de 24 heures. Le mélange du fragment Elmo $\Delta$ N avec la protéine SH3<sub>1</sub> semble donc être plus stable que celui avec le fragment ElmoPH.

Les échantillons sont ensuite centrifugés pour éliminer les agrégats avant d'être injectés sur la colonne (Figure 73). Le profil d'élution de l'échantillon Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub> à 25°C pendant 24 heures qui n'est pas présent sur la Figure 73, montre une diminution de l'absorbance du pic d'élution de la protéine Elmo $\Delta$ N jusqu'à 150 mAU et une baisse pour le pic d'élution de la protéine SH3<sub>1</sub> jusqu'à 40 mAU. Ce profil ne montre pas de nouveau pic d'élution correspondant à un complexe.



**Figure 73 : Profils d'élution des différents échantillons protéiques.**

Les profils d'élution des protéines seules et des mélanges protéiques sont superposés. La courbe de l'échantillon ElmoΔN/SH31 à 25°C n'a pas pu être représentée. Colonne superdex 75 10/300.

Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence la formation d'un complexe entre les fragments court de Elmo1 (ElmoΔN et ElmoPH) et la protéine SH3<sub>1</sub>. Toutefois, pour comprendre le phénomène d'agrégation qui se produit dans les mélanges protéiques nous avons vérifié la stabilité des protéines seules dans les mêmes conditions, les résultats sont présentés dans le Tableau XXVI.

	ElmoΔN	ElmoPH	SH3 <sub>1</sub>	ElmoΔN/SH3 <sub>1</sub>	ElmoPH/SH3 <sub>1</sub>
<b>6 h à 37 °C</b>	-	++	+	+	++
<b>6 h à 25 °C</b>	-	+	-	-	+
<b>24 h à 25 °C</b>	-	+	-	+	++

**Tableau XXVI : Précipitation des différents échantillons protéiques.**

(-) : pas de précipitation, (+) : légère précipitation, (++) : précipitation importante.

Le fragment ElmoPH semble plus sensible à la température que les autres protéines, il a précipité dans toutes les conditions, l'ajout de la protéine SH3<sub>1</sub> n'a pas modifié sa stabilité. Le fragment ElmoΔN, stable dans toutes les conditions a précipité lors de l'ajout de la protéine SH3<sub>1</sub>. Cela met en évidence un lien entre les deux protéines et pourrait faire penser qu'un complexe s'est formé entre les deux partenaires, mais qu'il est instable et a précipité.

### ***3) Microcalorimétrie isotherme de titration (ITC)***

Des expériences d'ITC sont réalisées dans le but de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre ElmoWT et le domaine SH3 de Dock1. Cinq mesures microcalorimétriques ont été effectuées avec différentes solutions (Tableau XXVII), mais celles-ci n'ont pas permis d'obtenir de données exploitables. Après avoir enregistré une expérience témoin, la protéine ElmoWT est injectée dans la cuve où se trouve l'échantillon protéique de SH3<sub>1</sub>. Le signal trop faible pour être analysé semble montrer une réaction endothermique. Nous avons ensuite injecté la protéine SH3<sub>1</sub> dans une cuve contenant l'échantillon protéique ElmoWT. Le signal est là aussi très faible, de plus il présente des irrégularités en montrant une réaction parfois endothermique, parfois exothermique, ou même parfois endothermique et exothermique pendant une même injection.

Ces premières expériences semblent montrer une instabilité des échantillons protéiques. Lorsque l'on met en présence les deux partenaires, plusieurs réactions s'additionnent. De nouvelles expériences témoins sont alors réalisées en injectant chaque protéine séparément dans une cuve ne contenant que du tampon. Lors de l'ajout de SH3<sub>1</sub> dans la cuve, une réaction endothermique avec un signal irrégulier se produit. Alors qu'avec l'ajout de la protéine ElmoWT dans la cuve, un fort signal exothermique est mesuré. L'intervalle entre deux réactions n'est pas assez long pour que le signal revienne à son niveau de base, ce qui entraîne une addition des signaux des différentes injections. Ces expériences témoins

montrent que les protéines SH3<sub>1</sub> et ElmoWT ne sont pas stables, des problèmes d'oligomérisation ou d'agrégation des échantillons doivent perturber les expériences.

	1	2	3	4	5
<b>Seringue</b>	Tampon	ElmoWT 65,81 $\mu$ M	SH3 <sub>1</sub> 292 $\mu$ M	SH3 <sub>1</sub> 284 $\mu$ M	ElmoWT 65 $\mu$ M
<b>Cuve</b>	Tampon	SH3 <sub>1</sub> 4 $\mu$ M	ElmoWT 32,5 $\mu$ M	Tampon	Tampon

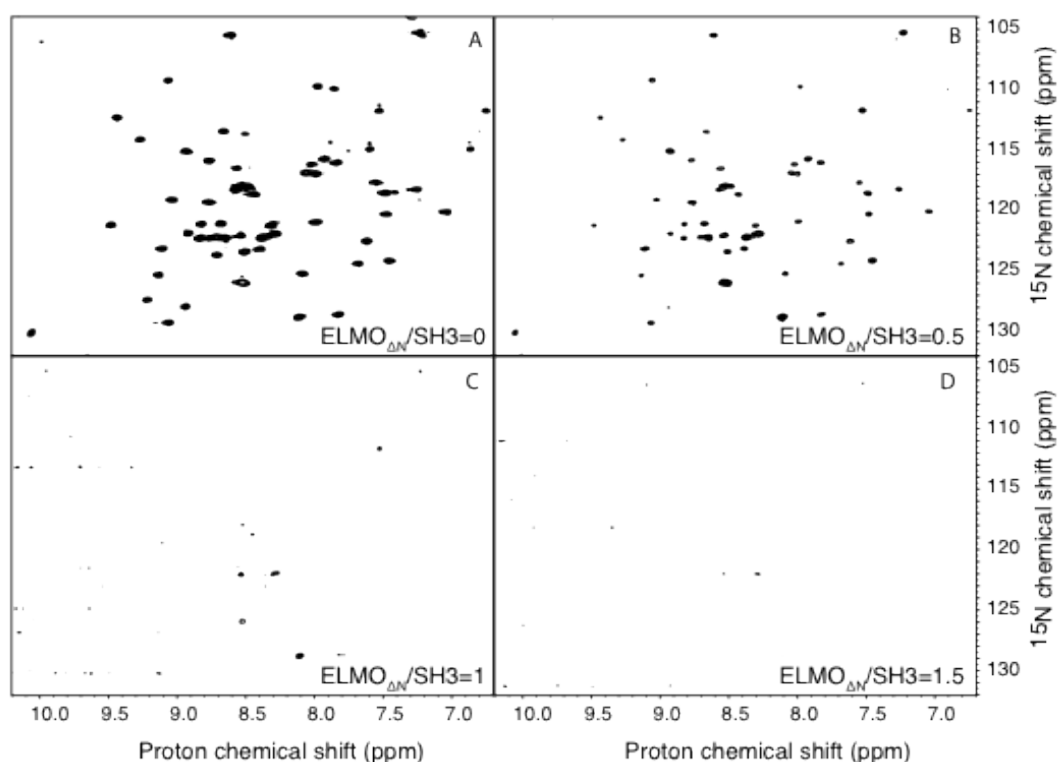
**Tableau XXVII : Récapitulatif des expériences d'ITC réalisées.**

La technique de l'ITC ne semble pas être adaptée à l'étude de l'interaction entre les protéines ElmoWT et Dock1. Nous allons donc utiliser d'autres approches pour obtenir des informations sur la formation de ce complexe.

## B . Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'interaction entre des fragments de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1 est étudié en collaboration avec Pierre Gans par RMN. Nous avons testé l'interaction de la protéine SH3<sub>1</sub> avec différents fragments de Elmo1 (ElmoWT et Elmo $\Delta$ N) mais aussi des peptides C-terminaux contenant le motif PxxP (Elmo702-716 et Elmo700-727).

Contrairement aux données expérimentales publiées (Komander, Patel et al. 2008), les expériences préliminaires de RMN réalisées avant mon arrivée dans le laboratoire montrent clairement que le domaine SH3 de Dock1 peut interagir avec la protéine ElmoWT en solution. L'addition d'une quantité stœchiométrique de la protéine ElmoWT à la protéine SH3<sub>1</sub> marquée au <sup>15</sup>N (<sup>15</sup>N-SH3<sub>1</sub>), entraîne la disparition totale du signal de RMN de la protéine <sup>15</sup>N-SH3<sub>1</sub>, confirmant l'interaction du domaine SH3 à ElmoW. L'addition du fragment Elmo $\Delta$ N conduit à des résultats similaires (Figure 74), indiquant clairement que la zone d'interaction est localisée dans cette région C-terminale. Ces résultats montrent aussi que l'impact sur le spectre RMN de la protéine <sup>15</sup>N-SH3<sub>1</sub> augmente avec la concentration de Elmo $\Delta$ N, suggérant un effet dose dépendant.



**Figure 74 :** Spectre 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC de la protéine  $^{15}\text{N}$ -SH3<sub>1</sub> en présence de (A) 0 ; (B) 0,5 (C) 1 et (D) 1,5 quantités équivalente de Elmo $\Delta\text{N}$ .

Toutefois, des résultats publiés précédemment suggèrent un rôle très limité de l'interaction du motif PxxP de Elmo1 dans la formation du complexe avec Dock1 (Grimsley, Kinchen et al. 2004; Komander, Patel et al. 2008). Dans le but d'évaluer cette hypothèse, Pierre Gans a étudié l'interaction entre la protéine  $^{15}\text{N}$ -SH3<sub>1</sub> et les peptides Elmo702-716 et Elmo700-727. De très faibles variations dans les déplacements chimiques sont observés pour quelques corrélations NH et seulement une lors d'un large excès de peptide. Les variations des déplacements chimiques augmentent avec la quantité de peptide ajouté à la solution, confirmant davantage le caractère dose dépendant du phénomène (Figure 75). En prenant en compte les conditions expérimentales, ces résultats suggèrent que l'affinité est très faible, de l'ordre du millimolaire.

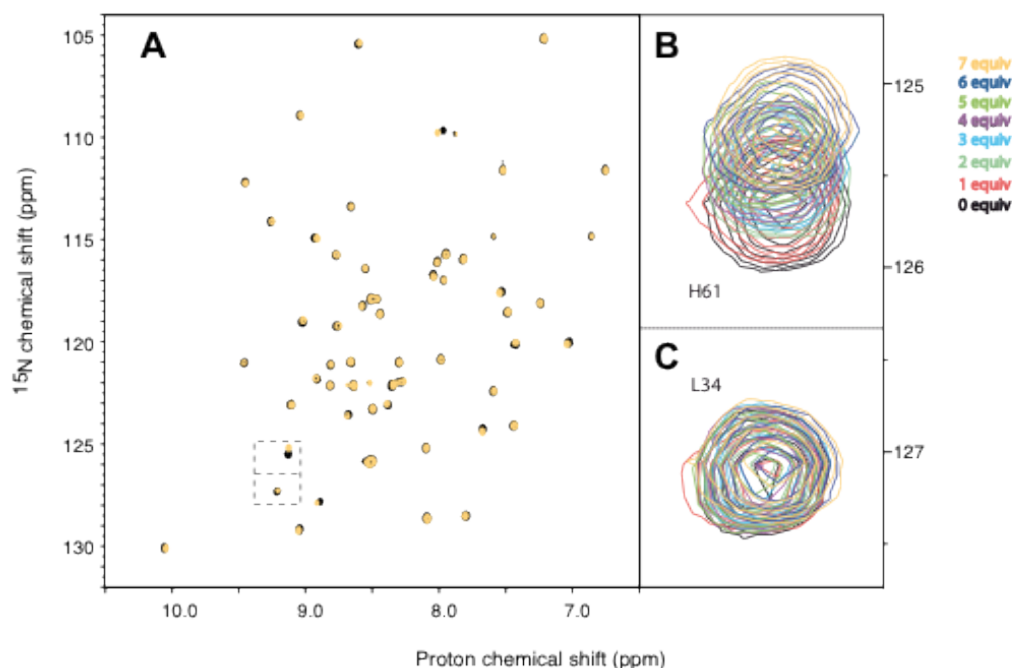


Figure 75 : Spectre 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC de  $200\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -SH3<sub>1</sub>.

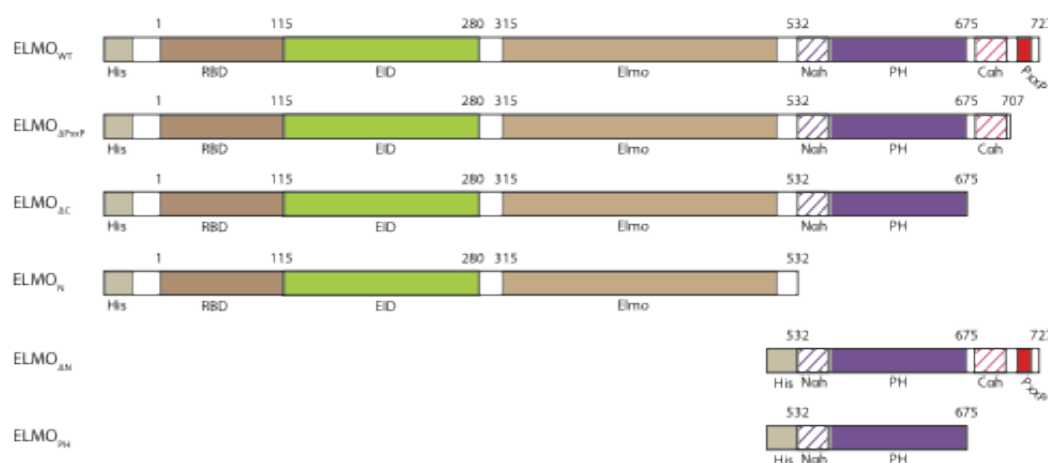
A :  $^{15}\text{N}$ -SH3<sub>1</sub> seul (en noir) et en présence de 7 quantités équivalentes du peptide Elmo702-716 (en jaune). A droite, les changements dans la fréquence de résonance de (B) H61 et (C) L34 en réponse à l'addition d'une quantité croissante du peptide Elmo702-716.

## C . Analyse par SPR

Avant le début de ma thèse, il n'y avait pas encore de données précises quant à l'importance des différentes zones mises en jeu dans l'interaction entre les protéines Elmo1 et Dock1. Nous savons que le motif PxxP C-terminal de Elmo1 interagit avec le domaine SH3 de Dock1 (Gumienny, Brugnera et al. 2001), mais nous avons appris plus tard qu'il n'était pas indispensable à l'interaction (Komander, Patel et al. 2008). Il semble aussi que l'hélice  $\alpha$  de Elmo, C $\alpha$ h (résidus 680-699), soit impliquée dans l'interaction (Grimsley, Kinchen et al. 2004). Au cours de ma thèse une publication de Komander a montré l'importance des résidus hydrophobes dans l'hélice  $\alpha$  N $\alpha$ h (résidus 532-558) qui apparaissent être essentiels dans l'interaction avec Dock1 (Komander, Patel et al. 2008). Le domaine d'interaction minimal de la protéine Elmo1 semble donc porté par les résidus 532 à 707. Cette région montre une affinité pour les résidus 1-187 de Dock1 avec un rôle prépondérant pour les résidus hydrophobes positionnés dans une région en hélice  $\alpha$  prédite dans Dock1 voisine du domaine SH3 (résidus 69-187). La structure du complexe Elmo $\Delta$ N/ SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$ , code pdb 3A98, déterminée récemment a permis de confirmer ces zones d'interaction.

Nous avons voulu comprendre l'importance du motif PxxP de Elmo1, du domaine PH et des hélices  $\alpha$  avoisinantes dans l'interaction avec Dock1. Les données actuelles ne

permettent pas de quantifier l'interaction entre Elmo1 et Dock1, d'où l'intérêt de réaliser une analyse par SPR qui permet de déterminer les différentes constantes d'affinité et cinétique ( $K_D$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$ ). Nous avons donc étudié l'interaction de différents fragments de Elmo1 (Figure 76) avec le domaine SH3 de Dock1 par SPR. Il n'a malheureusement pas été possible d'étudier l'interaction avec le domaine SH3-H $\alpha$  de Dock1 car cette protéine n'a pas pu purifiée seule, mais seulement en complexe, de manière soluble (en page 152).



**Figure 76 : Fragments de Elmo1 utilisés pour l'étude SPR.**

La technologie SPR est très sensible aux perturbations, les échantillons protéiques et les tampons utilisés doivent être parfaitement filtrés et ne pas précipiter lors des expériences pour éviter de boucher la microfluidique de l'appareil. Lors de ma thèse, il est malheureusement souvent arrivé que les appareils Biacore rencontrent des problèmes techniques qui m'ont ainsi empêché de réaliser les expériences d'interactions que j'avais préparées.

Les expériences demandent des quantités importantes de protéines purifiées qu'il faut donc produire en amont avec parfois un long travail de biologie moléculaire pour créer de nouvelles constructions de protéines contenant diverses étiquettes utiles à la SPR. Les fragments de protéine de Elmo1 ne sont pas stables à long terme en solution : une dégradation et une agrégation se produisent dans les jours qui suivent leur production. Un des défis des expériences de SPR que j'ai réalisées durant ma thèse a donc été d'obtenir des échantillons protéiques de bonne qualité (purs, homogènes et stables) en quantité suffisante dans un délai très restreint avant de réaliser les expériences.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'étude de l'interaction des fragments



courts de Elmo1 (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH), car d'après les données bibliographiques, la zone d'interaction n'est portée que par cette région. Après plusieurs tentatives infructueuses d'analyse, nous avons fini par étudier les fragments longs (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP) de Elmo1 qui nous ont permis d'obtenir des données correctes d'affinité.

### ***1) Analyse de l'interaction avec les fragments courts***

Les fragments courts, Elmo $\Delta$ N (résidus 532-727) et ElmoPH (résidus 532-675) sont tous les deux tronqués de la région N-terminale. La région C-terminale contenant le motif PxxP et l'hélice C $\alpha$ H a été aussi supprimée du fragment ElmoPH (Figure 76).

L'interaction des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH avec la protéine SH3<sub>1</sub> a été analysée grâce à différentes techniques de couplage. La comparaison des différentes constantes cinétiques pourra permettre de mettre en évidence le rôle de la région 675-727 de Elmo1 contenant l'hélice C $\alpha$ H et le motif PxxP.

#### ***(a) Analyse par couplage amine du ligand***

##### ***(i) Cinétique multi-cycles***

##### ***• Détermination des constantes cinétiques***

Une surface est fonctionnalisée par couplage amine avec la protéine SH3<sub>1</sub> à différents niveaux d'immobilisation (Tableau XXVIII). Une gamme de concentrations croissantes de Elmo $\Delta$ N et de ElmoPH est réalisée (Figure 77).

	<b>Piste 1</b>	<b>Piste 2</b>	<b>Piste 3</b>	<b>Piste 4</b>
<b>Niveau de SH3<sub>1</sub> immobilisé</b>	-	2760 RU	5530 RU	3740 RU

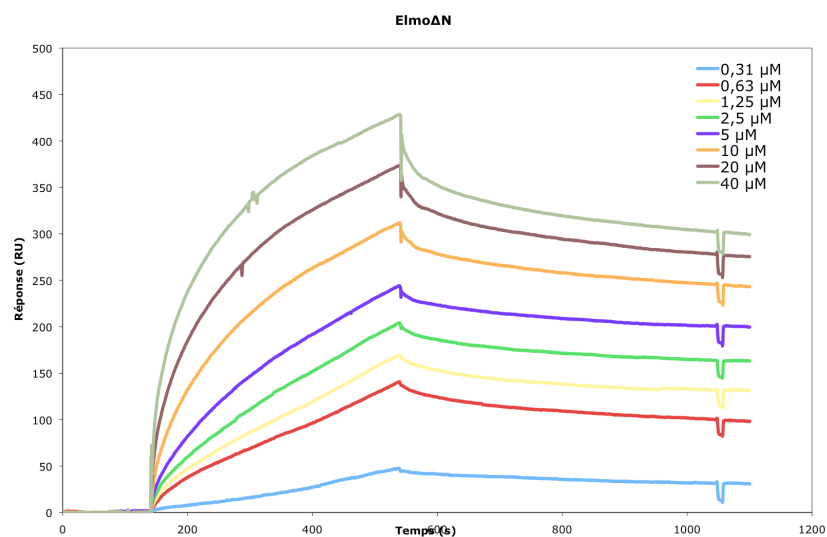
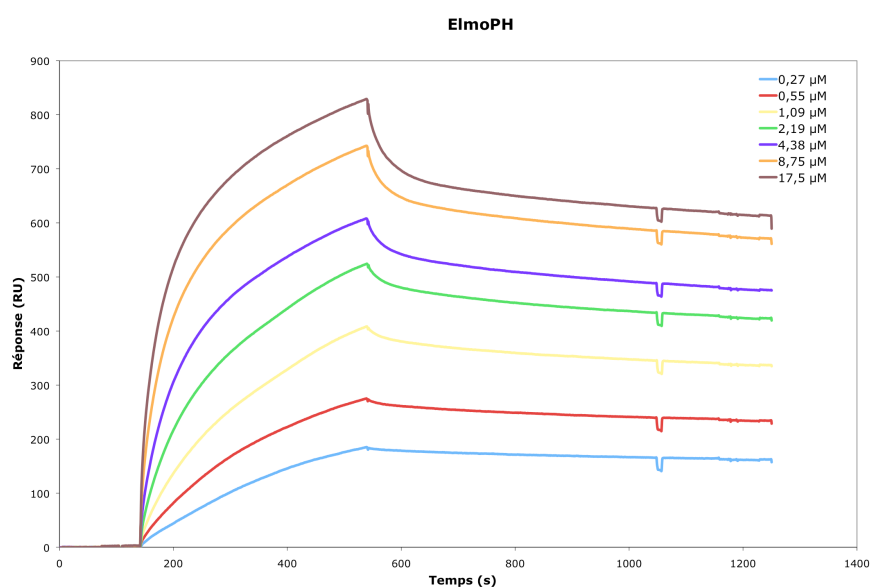
**Tableau XXVIII : Niveaux d'immobilisation du ligand SH3<sub>1</sub> sur la puce.**

Cette étude cinétique confirme tout d'abord l'interaction des deux fragments de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock1. L'interaction du fragment ElmoPH montre que le motif PxxP et l'hélice C $\alpha$ H ne sont pas nécessaires à l'interaction, comme le suggèrent Komander et collaborateurs (Komander, Patel et al. 2008).

L'état stationnaire n'est pas atteint, une expérience complémentaire avec une injection pendant 1200 s de chaque fragment à 5  $\mu$ M n'a d'ailleurs pas non plus suffi à atteindre cet état d'équilibre de réaction.

L'interaction entre les fragments de Elmo1 et SH3<sub>1</sub> est forte car la dissociation des

complexes n'est pas totale après plus de 1000 s. D'ailleurs, même après nos étapes de régénération (trois injections de 10  $\mu$ l de Glycine pH2 à 10 mM), les niveaux de base ne sont toujours pas atteints.

**A****B**

**Figure 77 : Sensorgrammes SPR de l'interaction des fragments Elmo $\Delta$ N et ElmoPH avec SH3<sub>1</sub> sur la piste 3.**

**A : Sensorgrammes obtenus par injection du fragment Elmo $\Delta$ N. B : Sensorgrammes obtenus par injection du fragment ElmoPH.**

L'analyse de ces courbes afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction est réalisée grâce au programme Biaevaluation. Plusieurs modèles sont testés (Langmuir 1 : 1 avec ou sans dérive de la ligne de base et transfert de masse, ligand hétérogène, analyte hétérogène...), mais il n'a pas été possible de calculer des ajustements corrects et de déduire

des paramètres fiables d'après ces courbes. Les valeurs de  $\chi^2$  sont trop élevées (supérieurs à 20), et les ajustements ne suivent pas les courbes expérimentales pour toutes les concentrations.

- *A chaque problème sa solution*

L'impossibilité de calculer des ajustements corrects avec ces sensorgrammes peut être due à plusieurs problèmes. Nous allons ici tenter d'analyser les différentes causes possibles et chercher quelles stratégies peuvent être mises en place pour y pallier.

⇒ *Oligomérisation de l'analyte*

Nous pouvons penser que ces problèmes d'ajustements sont peut-être dus à une oligomérisation ou une agrégation des analytes, en effet nous avons vu plus tôt que ces protéines ont la capacité de se dimériser ; de plus les échantillons présentent une instabilité dans le temps avec un phénomène d'agrégation. Il est possible qu'une fois la protéine Elmo1 fixée au ligand SH3<sub>1</sub>, d'autres protéines Elmo1 viennent elles aussi se fixer à l'analyte déjà en interaction sur la puce entraînant une augmentation non spécifique et significative du signal.

Si le problème provient d'une dimérisation, la réponse de cette interaction pourrait être comparée à un modèle à double ligand, le premier ligand serait la protéine SH3<sub>1</sub> immobilisée sur la puce et le deuxième, le fragment de Elmo1 fixé à SH3<sub>1</sub> qui entre à son tour en interaction avec les fragments de Elmo1 pour se dimériser. Les modèles de ligand hétérogènes testés ici n'ont pourtant pas permis d'obtenir des ajustements corrects. Nous pouvons donc raisonnablement penser qu'il s'agit ici d'un phénomène d'agrégation locale au niveau de la puce.

La protéine SH3<sub>1</sub> n'a jamais montré de tendance à s'oligomériser ou s'agréger, il serait donc intéressant de pouvoir immobiliser les protéines Elmo1 sur la puce et utiliser SH3<sub>1</sub> comme analyte. Les essais de couplage amine avec Elmo1 effectués par Jean-Baptiste Reiser avant mon arrivée au laboratoire n'ont pas été fructueux. Nous allons donc tenter d'autres approches comme l'immobilisation grâce à son étiquette hexahistidine ou par une étiquette de biotinylation.

⇒ *Régénération insuffisante*

Un autre problème pouvant expliquer les difficultés à calculer des ajustements corrects pourrait être le non-retour au niveau de base sur chaque piste après chaque association-dissociation. En effet, un certain nombre de ligands sont ainsi déjà bloqués par l'interaction précédente, ce qui induit donc une diminution de la réponse maximale possible ( $R_{max}$ ) à

chaque nouvelle injection sur la puce.

Une méthode récemment mise au point par l'équipe de Myszk (Karlsson, Katsamba et al. 2006) permet d'analyser des cinétiques où les injections d'analyte se suivent sans retour du signal au niveau de base entre elles, on l'appelle la cinétique de titration en un seul cycle. Cette méthode sera utilisée pour la suite des expériences.

### ⇒ *Orientation du ligand*

L'immobilisation du ligand SH3<sub>1</sub> sur la puce par le couplage amine, ne permet pas d'orienter celui-ci. Toutes les protéines SH3<sub>1</sub> ne sont pas orientées de la même façon, les sites d'interaction pour la protéine Elmo1 ne sont donc pas forcément tous accessibles. Cette différence risque donc d'entraîner des cinétiques d'association et de dissociation différentes selon l'accessibilité des sites d'interaction. La courbe de réponse que l'on observe alors représente la somme de toutes ces cinétiques, qu'il ne sera pas possible d'analyser correctement.

Un modèle d'ajustement correspondant à un ligand hétérogène pourrait être adéquat dans cette situation et permettre ainsi de déterminer les constantes cinétiques correspondant à chaque orientation du ligand. Malheureusement, dans notre cas, ce modèle n'a pas permis de déterminer des constantes cinétiques.

Une orientation unique du ligand sur la puce permettrait d'éviter ces problèmes. Nous avons tenté plusieurs approches pour cela en utilisant l'immobilisation via des étiquettes insérées à une extrémité des protéines (étiquette poly-histidine, étiquette GST et étiquette de biotinylation).

### (ii) Cinétique de titration en un seul cycle

Comme nous venons de le voir, la régénération de la puce après l'interaction de l'analyte n'est pas complète, et les différentes solutions de régénérations testées n'ont pas permis d'obtenir un retour au niveau de base. Nous avons donc utilisé la méthode de la cinétique de titration en un seul cycle décrite par l'équipe de Myszk (Karlsson, Katsamba et al. 2006). Cette méthode est basée sur des sensorgrammes enregistrés sur près d'une heure trente minutes regroupant les injections des cinq concentrations croissantes d'analyte. La durée de ce sensorgramme est un point très sensible pour l'enregistrement de données correctes. En effet, nous nous sommes heurtés de nombreuses fois à des sensorgrammes instables montrant un saut de la ligne de base ou des pics anarchiques qui ont rendus

inutilisables tout l'enregistrement. Il a donc fallu refaire certaines expériences plusieurs fois avant d'obtenir des sensorgrammes stables.

Une surface est fonctionnalisée par couplage amine avec la protéine SH3<sub>1</sub> (sur les pistes 2 et 3) et avec la protéine GST-SH3<sub>1</sub> (sur la piste 4) à différents niveaux d'immobilisation (Tableau XXIX). Trois gammes de cinq concentrations croissantes de ElmoΔN et de ElmoPH sont réalisées (Tableau XXX).

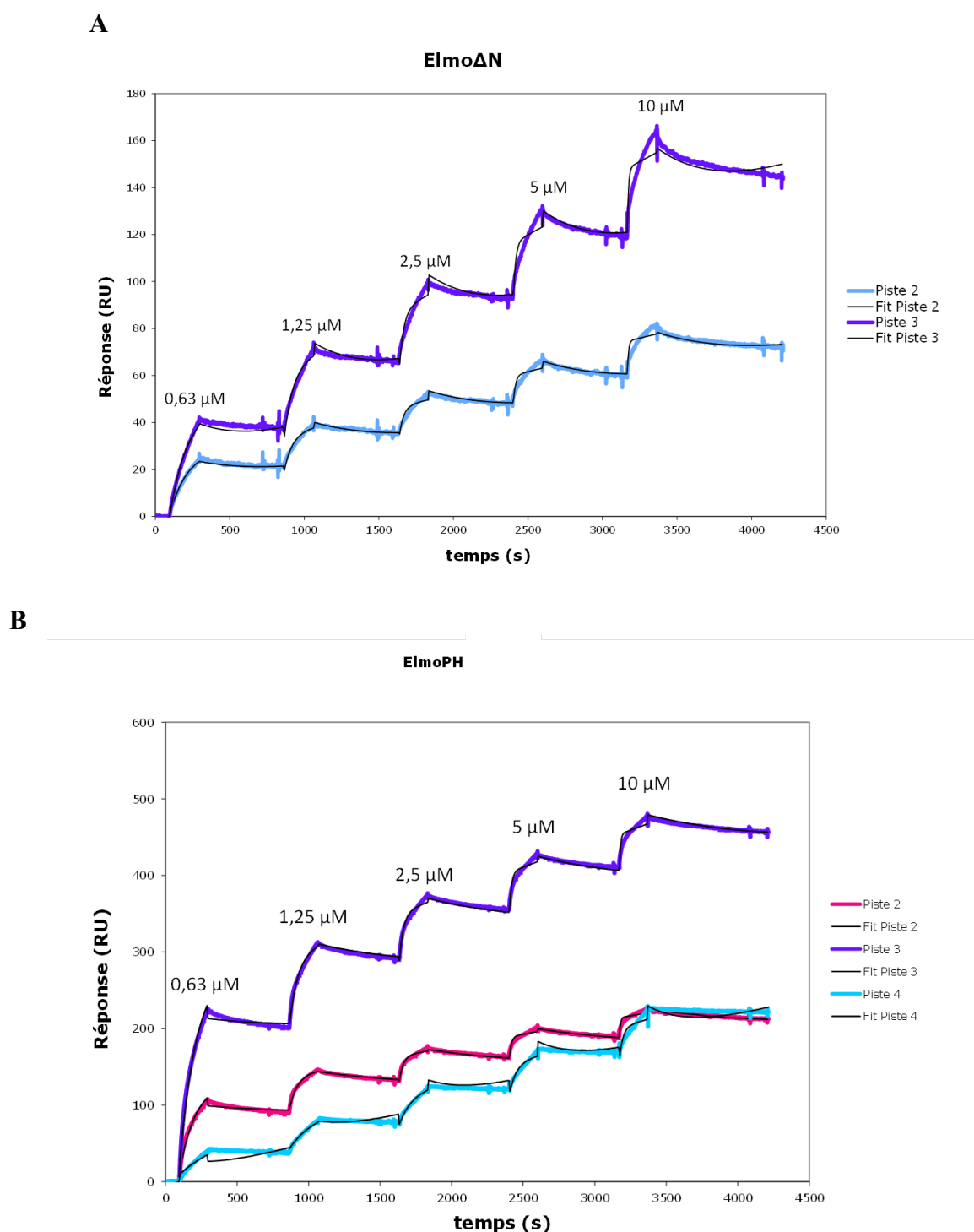
	Piste 1	Piste 2	Piste 3	Piste 4
<b>Niveau de Ligand immobilisé</b>	-	1660 RU	3000 RU	4340 RU

Tableau XXIX : Niveaux d'immobilisation du ligand SH3<sub>1</sub> sur la puce.

	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3
<b>Conc 1 (μM)</b>	0,08	0,63	2,5
<b>Conc 2 (μM)</b>	0,16	1,25	5
<b>Conc 3 (μM)</b>	0,31	2,5	10
<b>Conc 4 (μM)</b>	0,63	5	20
<b>Conc 5 (μM)</b>	1,25	10	40

Tableau XXX : Gammes de concentration de ElmoΔN et ElmoPH utilisées.

Lors des injections du fragment ElmoΔN sur la piste 4, où la protéine GST-SH3<sub>1</sub> est immobilisée, le signal est trop faible pour être analysé. Nous pouvons aussi remarquer que la réponse pour ce fragment ElmoΔN est significativement plus faible que pour le fragment ElmoPH aux mêmes concentrations sur les pistes 2 et 3. Les réponses lors des associations de chaque série d'analyte ne montrent pas le même profil. En effet, pour certaines séries, la réponse est maximale pour la plus petite concentration en analyte puis diminue jusqu'à la plus forte concentration, comme si le ligand est saturé après la première injection. Pour d'autres c'est le contraire, la réponse augmente en fonction de la concentration. Et parfois, comme dans le cas de la piste 3 lors de l'injection de la série du fragment ElmoΔN ayant la concentration maximale de 10 μM (Figure 78), la réponse est maximale pour la première injection, puis diminue lors des deux suivantes pour ensuite augmenter pour les deux injections les plus concentrées en analyte. Nous ne pouvons pas expliquer clairement ces différences, il est possible que des phénomènes d'agrégation sur les pistes en soit responsable.



**Figure 78 : Sensorgrammes de l'interaction des fragments ElmoΔN et ElmoPH avec SH3<sub>1</sub> par cinétique de titration en un seul cycle.**

La protéine SH3<sub>1</sub> est immobilisée sur les pistes 2 et 3, la protéine GST-SH31 est immobilisée sur la piste 4. Ajustement avec le modèle de Langmuir 1 : 1 en noir pour chaque courbe.

A : Courbes pour ElmoPH. B : Courbes pour ElmoΔN.

Malgré l'allure des courbes, leur analyse pour déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction est réalisée grâce au programme Biaevaluation. Le modèle de cinétique de Langmuir 1 : 1 avec ou sans transfert de masse a été testé, mais comme attendu, il n'a pas été

possible de calculer des ajustements corrects d'après ces courbes. Les valeurs de  $\chi^2$  sont trop élevées, et les ajustements ne suivent pas les courbes expérimentales (Figure 78). Nous avons donc utilisé le programme d'ajustement Fityk (Wojdyr 2010) avec les scripts écrits par Dominique Housset (en page 120). Deux modèles ont ainsi pu être testés : le modèle de Langmuir 1 :1 équivalent au modèle du programme Biaevaluation et un modèle d'interaction à deux ligands. Malheureusement, aucun de ces modèles n'a permis de calculer des courbes d'ajustements correspondant aux courbes de cinétiques. La méthode de la cinétique en un seul cycle a permis de s'affranchir des problèmes de régénération de la puce mais ne permet toujours pas de déterminer les constantes cinétiques.

L'immobilisation du ligand par couplage amine n'a donc pas permis de déterminer des constantes cinétiques des associations. De nouvelles expériences ont été réalisées en tentant d'orienter l'immobilisation du ligand sur la puce.

### ***(b) Analyse par couplage sur une puce NTA***

Dans le but de résoudre les problèmes d'agrégation des fragments de la protéine Elmo1 utilisés en tant qu'analyte et les problèmes d'orientation du ligand nous avons utilisé une méthode d'immobilisation par affinité. Les fragments de Elmo1 ont été immobilisés sur une surface NTA chargée en Nickel grâce à l'affinité de leur étiquette hexahistidine. La protéine SH3<sub>1</sub> a été utilisée cette fois comme analyte.

Une surface NTA chargée en Nickel est fonctionnalisée par couplage avec les fragments Elmo $\Delta$ N ou ElmoPH sur la puce à des niveaux compris entre 300 RU et 1400 RU. Le niveau d'immobilisation des ligands n'est pas stable, une diminution de plus de 10% en 20 minutes est observable. En espérant atteindre un seuil où le ligand ne se décroche plus, nous avons lavé la surface avec le tampon de course pendant près d'1 heure 30 minutes. Au bout de ce temps-là, une décroche sur certaines pistes était toujours en cours, mais sur d'autre un phénomène inverse est apparu, après une première phase de diminution, le niveau de réponse augmente progressivement. C'est notamment le cas de la piste de référence. Des essais d'interaction ont tout de même été effectués avec la protéine SH3<sub>1</sub>. Ceux-ci montrent une interaction de l'analyte plus importante avec la piste de référence qu'avec les pistes où le ligand est immobilisé. Il n'a donc pas été possible d'exploiter ces données.

### ***(c) Analyse par capture GST***

L'orientation de la protéine SH3<sub>1</sub> lors de son immobilisation est permise grâce au couplage de la GST de la construction GST-SH3<sub>1</sub> sur une puce chargée en anticorps anti-GST (en page 116). La méthode utilisée est la cinétique de titration en un seul cycle.

Une surface est fonctionnalisée par couplage secondaire avec la protéine GST-SH3<sub>1</sub> à un niveau de 2720 RU sur la piste 4. La piste de référence est constituée d'anticorps anti-GST couplé à de la GST recombinante. Plusieurs essais de cinétique avec les protéines ElmoΔN et ElmoPH ont été réalisés, les niveaux de réponse des associations sont très faibles et ne se distinguent pratiquement pas du bruit de fond. Il n'a donc pas été possible d'obtenir de sensorgramme correct avec cette méthode de couplage.

### ***(d) Analyse par capture streptavidine***

L'ajout d'une étiquette de biotinylation aux différents fragments de Elmo1 et à la protéine SH3<sub>1</sub> permet d'immobiliser l'une ou l'autre des protéines sur une puce chargée en streptavidine de façon orientée. Cette technique utilisée dans le cadre d'une cinétique de titration en un seul cycle devrait permettre de s'affranchir de la majorité des problèmes rencontrés auparavant.

Une surface est fonctionnalisée avec le fragment ElmoΔN-BirA biotinylé à un niveau de 2760 RU. La piste de référence est constituée de streptavidine. Les essais d'interaction réalisés avec la protéine SH3<sub>1</sub> comme analyte à différentes concentrations montrent une interaction plus importante de l'analyte sur la piste de référence que sur la piste où le ligand est immobilisé. Il semblerait qu'il y ait une interaction non spécifique de l'analyte avec la streptavidine.

Nous avons donc inversé le ligand et l'analyte pour analyser cette interaction. Une surface est fonctionnalisée avec la protéine SH3-BirA biotinylée à deux niveaux (2500 RU sur la piste 3 et 1500 RU sur la piste 4). La piste de référence est constituée de streptavidine. Les essais d'interaction réalisés avec les fragments ElmoΔN et ElmoPH à différentes concentrations montrent là aussi une meilleure interaction sur la piste de référence.

Nous n'avons donc pas réussi à obtenir de données sur l'interaction entre les fragments ElmoΔN et ElmoPH et la protéine SH3<sub>1</sub>, par la méthode de couplage par la streptavidine. Le blocage de la streptavidine de la piste de référence par une protéine biotinylée non pertinente pourrait permettre d'empêcher les interactions non spécifiques de l'analyte. Cette protéine non pertinente doit être connue pour ne pas être un interactant de



l'analyte.

L'analyse de l'interaction des fragments court de Elmo1 ne contenant pas la région N-terminale de la protéine (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH) n'a pas permis d'obtenir de données cinétiques. Nous avons pu voir plus tôt que l'interaction de ces fragments avec le domaine SH3 entraîne une agrégation des protéines (en page 168). L'absence de la région N-terminale de Elmo1 déstabilise ces fragments, ce qui ne permet donc pas d'obtenir de données exploitables d'interaction par SPR. Nous avons donc ensuite réalisé les expériences de SPR avec les fragments longs de Elmo1 (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP).

## ***2) Analyse de l'interaction avec les fragments longs***

Les fragments longs ElmoWT (résidus 1-727), Elmo $\Delta$ C (résidus 1-675) et Elmo $\Delta$ PxxP (résidus 1-707) possèdent tous la région N-terminale et le domaine PH. La région C-terminale contenant le motif PxxP et l'hélice C $\alpha$ h a été supprimée du fragment Elmo $\Delta$ C, et pour le fragment Elmo $\Delta$ PxxP, seul le motif PxxP a été supprimé (Figure 76).

Nous avons étudié l'interaction du domaine SH3 de Dock1 avec les fragments long de Elmo1 (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP). Ces interactions sont analysées grâce à différentes techniques de couplage. Cette étude va permettre de mettre en évidence l'importance du motif PxxP et de l'hélice C $\alpha$ h dans l'interaction avec le domaine SH3.

### ***(a) Analyse par couplage amine***

Des premiers essais d'interaction entre les fragments longs (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ PxxP) et la protéine SH3<sub>1</sub> immobilisée par couplage amine sur une puce sont réalisés. Ils ont montré, comme pour les fragments courts (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH), qu'aucune des solutions de régénération testées ne permet de régénérer la puce après une interaction. Nous avons donc utilisé là aussi la méthode de cinétique de titration en un seul cycle.

Une première surface est fonctionnalisée par couplage amine avec la protéine SH3<sub>1</sub> à différents niveaux d'immobilisation (730 RU sur la piste 2 et 1700 RU sur la piste 3). Deux gammes de cinq concentrations croissantes de ElmoWT et de Elmo $\Delta$ C sont injectées sur cette puce (Tableau XXXI). Une seconde surface est fonctionnalisée avec la protéine SH3<sub>1</sub> à différents niveaux d'immobilisation (1650 RU sur la piste 2, 1070 RU sur la piste 3 et 2925 RU sur la piste 4). Une gamme de cinq concentrations croissantes de Elmo $\Delta$ PxxP est injectée

sur cette puce (Tableau XXXI).

	<b>ElmoWT</b>		<b>ElmoΔC</b>		<b>ElmoΔPxxP</b>
	<b>Gamme 1</b>	<b>Gamme 2</b>	<b>Gamme 1</b>	<b>Gamme 2</b>	<b>Gamme 1</b>
<b>Conc 1 (μM)</b>	0,75	3	0.83	1,66	3,31
<b>Conc 2 (μM)</b>	1,5	6	1,66	3,31	6.61
<b>Conc 3 (μM)</b>	3	12	3,31	6,63	13,23
<b>Conc 4 (μM)</b>	6	24	6,63	13,25	26,45
<b>Conc 5 (μM)</b>	12	48	13,25	26,5	52,9

**Tableau XXXI : Gammes de concentration de ElmoWT, ElmoΔC et ElmoΔPxxP utilisées.**

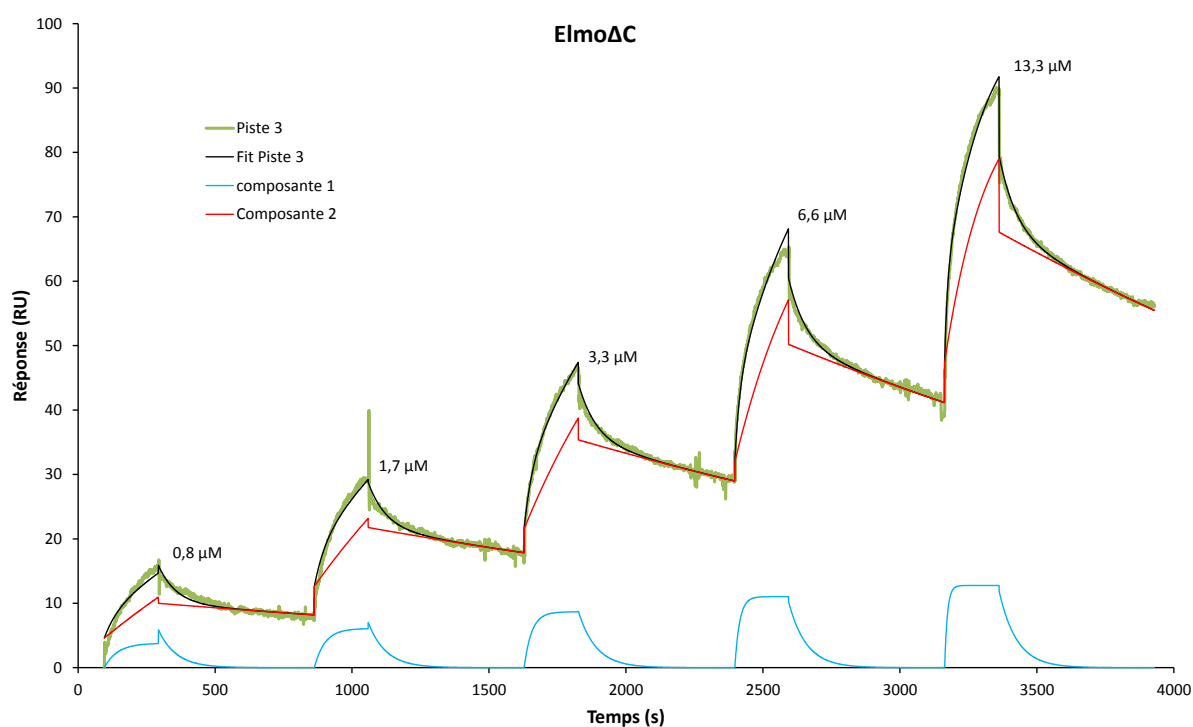
Les courbes du fragment ElmoΔPxxP n'ont pas pu être traitées. La soustraction de la réponse sur la piste de référence ne se fait pas correctement. En effet, des portions de la courbe expérimentale ne semblent ne pas coïncider avec celles de la piste de référence malgré de nombreuses tentatives pour aligner les différentes pistes. Il n'a pas été possible d'analyser ces courbes.

Comme nous l'avons vu précédemment il est très difficile d'enregistrer un sensorgramme sur un grand intervalle de temps (près d'1 heure 30 minutes) sans problèmes de niveau de base. Les courbes aux fortes concentrations de la protéine ElmoWT montrent des pics de réponse aléatoires et non spécifiques, ces zones ne doivent pas être utilisées lors des calculs d'ajustement. En effet, ces réponses aléatoires dans le temps et non spécifiques de l'interaction proviennent certainement d'aléas techniques comme des microbulles, des micropoussières ou des bruits électroniques. Contrairement au programme Fityk, le programme Biaevaluation ne permet pas d'écarter certains points de la courbe pour calculer des ajustements. Nous avons donc utilisé le programme Fityk, en prenant soin de d'écarter la zone correspondant au problème qui ne servira pas aux différents calculs d'ajustement (Figure 80).

Un modèle d'interaction de Langmuir 1 :1 a tout d'abord été testé, les courbes des ajustements calculés ont des  $\chi^2$  compris entre 0,68 et 0,98. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2012 dans le journal Biochimie (Sevajol, Reiser et al. 2012).

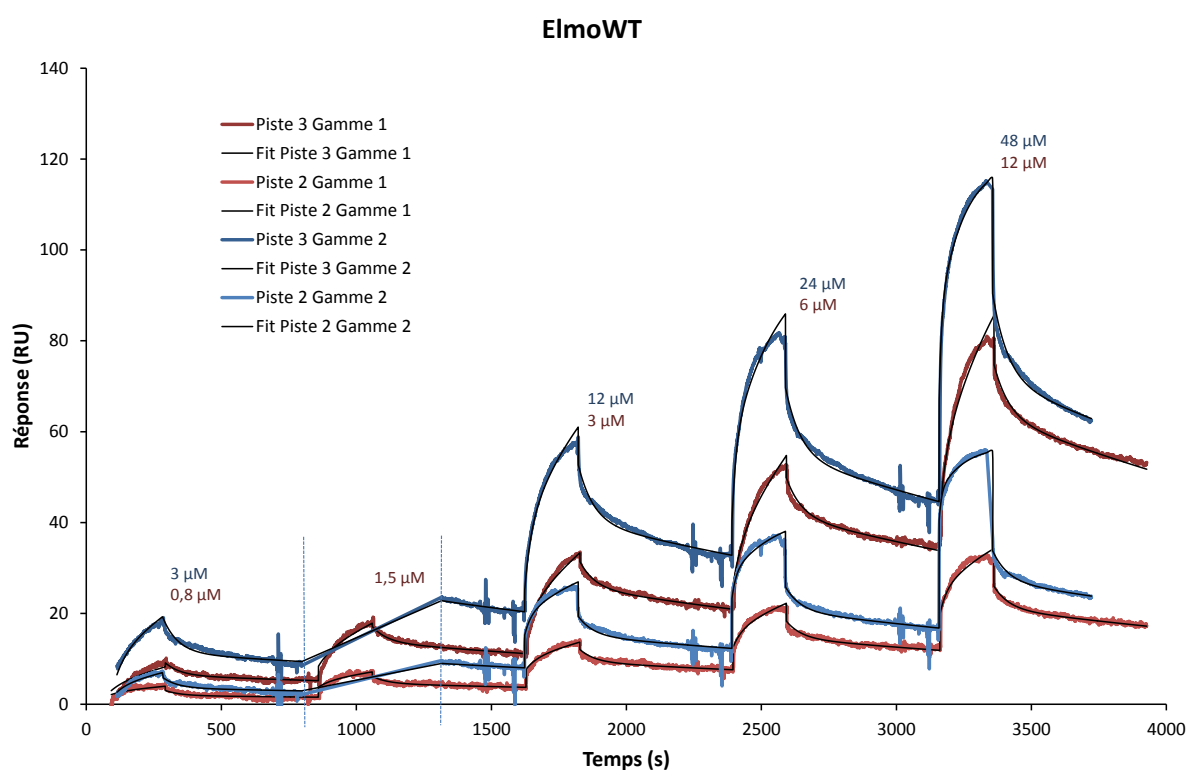
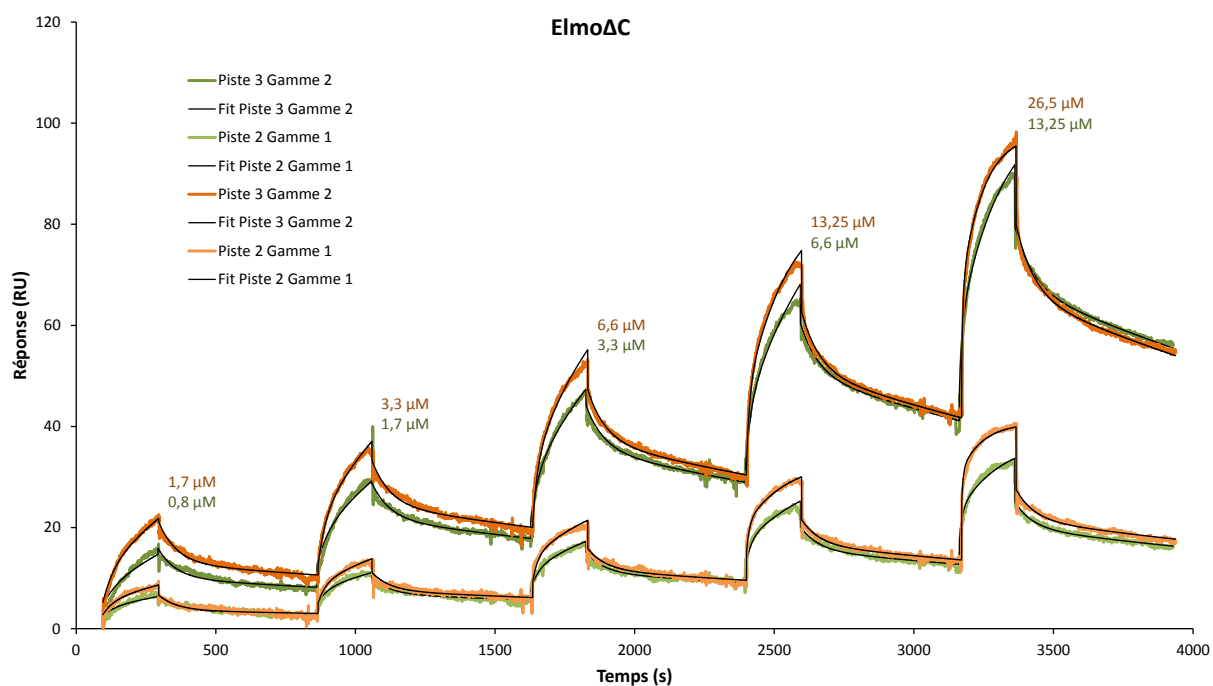
Nous avons ensuite voulu analyser plus précisément ces interactions car malgré des valeurs de  $\chi^2$  correctes, la superposition des courbes des ajustements du modèle 1 :1 avec celles expérimentales montre certaines imprécisions en ne se superposant pas parfaitement. En effet, les courbes expérimentales semblent montrer deux cinétiques différentes, une première composante avec une association et une dissociation rapide puis une seconde plus

lente. Le couplage amine du ligand entraîne une hétérogénéité du ligand à cause des différentes orientations possibles sur la puce. Le site d'interaction du ligand exposé à l'analyte pourra donc être entièrement ou seulement partiellement accessible. Pour tenter d'obtenir des informations plus précises, nous avons mis en place deux méthodes. La première consiste à utiliser un modèle à double ligand pour calculer des ajustements sur ces courbes qui permet de modéliser deux réactions d'interaction aux cinétiques différentes (Figure 79 et Figure 80). Et la seconde réside dans le fait d'essayer de rendre homogène la fixation du ligand sur la puce en mettant en place une approche de couplage orienté (cette méthode sera décrite plus loin, en page 188).



**Figure 79 : Détail des deux composantes de l'ajustement à deux ligands pour ElmoΔC.**

La composante rapide est en bleu, la composante plus lente en rouge, et la résultante de ces deux composantes en noir. La courbe expérimentale est en vert.

**A****B**

**Figure 80 : Sensorgrammes de l'interaction de la protéine ElmoWT et Elmo $\Delta$ C par cinétique de titration en un seul cycle.**

**A :** Courbes de ElmoWT. La zone entre les tirets bleus correspond à une zone où il y a eu un problème technique sur l'appareil, elle n'est pas prise en compte dans l'ajustement pour la gamme 2. **B :** Courbes de Elmo $\Delta$ C.

	<b>ElmoWT</b>	<b>ElmoΔC</b>
<b>Chi<sup>2</sup></b>	0,96	0,51
<b>k<sub>a</sub> 1 (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	2105,19	6313,9
<b>k<sub>d</sub> 1 (s<sup>-1</sup>)</b>	180,02.10 <sup>-4</sup>	155,86.10 <sup>-4</sup>
<b>K<sub>D</sub>1 (M)</b>	8,55.10 <sup>-6</sup>	2,47.10 <sup>-6</sup>
<b>k<sub>a</sub> 2 (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	218,84	466,03
<b>k<sub>d</sub> 2 (s<sup>-1</sup>)</b>	3,58.10 <sup>-4</sup>	3,49.10 <sup>-4</sup>
<b>K<sub>D</sub>2 (M)</b>	1,63.10 <sup>-6</sup>	0,75.10 <sup>-6</sup>

**Tableau XXXII : Paramètres des cinétiques des ajustements à double ligand par Fityk.**

Les ajustements de ces courbes se superposent mieux aux courbes expérimentales qu'avec le modèle d'ajustement 1:1, montrant une meilleure cohérence du modèle. Les valeurs de Chi<sup>2</sup>, inférieures à 1, sont d'aussi bonne qualité (Tableau XXXII). Ce modèle à double ligand semble raisonnable, nous n'avons ainsi pas testé d'autres modèles d'interaction possible.

Il n'est pas possible à cette étape d'attribuer avec certitude une signification fonctionnelle à chacune des deux cinétiques. Cependant, le caractère très éphémère de l'interaction caractérisée par la composante 1, avec des constantes de dissociation k<sub>d</sub> de 0,018 et 0,016 s<sup>-1</sup>, ne semble pas en adéquation avec le rôle biologique de Elmo1 de régulation et recrutement à la membrane de Dock1. Il pourrait s'agir d'une interaction avec un site d'interaction non complet sur le domaine SH3. Il semblerait ainsi que les constantes représentant la réelle interaction de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock1 soient représentées par la composante 2 plus lente.

Une différence bien que faible est identifiable entre les valeurs de la protéine entière ElmoWT et du fragment ElmoΔC où la région C-terminale est absente. En effet, nous pouvons voir que l'association du fragment ElmoΔC avec un k<sub>a</sub> de 466 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> est deux fois plus rapide que pour la protéine entière ElmoWT avec un k<sub>a</sub> de 219 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. La mise en place d'un plus grand nombre de liaisons pour ElmoWT grâce à l'interaction du motif PxxP avec le domaine SH3 peut expliquer une association plus lente. La vitesse de dissociation des complexes avec chacun des fragments de Elmo1 ne montre pas de différence significative.

Les complexes formés avec ou sans le motif PxxP ont une constante d'affinité faible, de l'ordre du micromolaire : 1,6 μM pour ElmoWT et 0,8 μM pour ElmoΔC. La différence entre les deux fragments semble montrer une meilleure affinité pour le complexe formé du

fragment Elmo $\Delta$ C, sans le motif PxxP.

La difficulté rencontrée durant l'analyse des courbes expérimentales pour décomposer les deux composantes de l'interaction nous permet d'émettre des réserves quant à la fiabilité de toutes ces valeurs.

### ***(b) Analyse par couplage GST***

L'orientation de l'immobilisation de la protéine SH3<sub>1</sub> est permise grâce au couplage GST de la construction GST-SH3<sub>1</sub> sur une puce chargée en anticorps anti-GST (en page 116). La méthode utilisée est la cinétique de titration en un seul cycle.

Une surface est fonctionnalisée par couplage secondaire avec la protéine GST-SH3<sub>1</sub> à un niveau de 2080 RU sur la piste 2, de 2010 RU sur la piste 3 et de 950 RU sur la piste 4. La piste de référence est constituée d'anticorps anti-GST couplé à de la GST recombinante. Plusieurs essais de cinétique avec les protéines ElmoWT et Elmo $\Delta$ C sont réalisés. La réponse lors de l'association est plus importante sur la piste de référence que sur les pistes où le ligand est immobilisé. Il est donc impossible de déterminer des constantes cinétiques de cette association avec ces données.

### ***(c) Analyse par couplage streptavidine***

L'ajout d'une étiquette de biotinylation aux différents fragments de Elmo1 et à la protéine SH3<sub>1</sub> permet d'immobiliser l'une ou l'autre des protéines sur une puce chargée en streptavidine de façon orientée. Cette technique utilisée dans le cadre d'une cinétique de titration en un seul cycle devrait permettre de s'affranchir de la majorité des problèmes rencontrés auparavant.

#### **(i) Les fragments de Elmo1 utilisés comme ligands**

Une surface est fonctionnalisée avec le fragment ElmoWT-BirA biotinylé à un niveau de 690 RU sur la piste 3 et avec le fragment Elmo $\Delta$ C-BirA biotinylé à un niveau de 1510 RU. La piste 1 sert de référence avec de la streptavidine immobilisée dessus. La piste 2 sert de double référence avec de la streptavidine sur laquelle du lysosyme biotinylé est fixé. Le lysosyme joue le rôle de protéine non relevante comme expliqué en page 182. Immobilisé avec des quantités semblables aux quantités des protéines d'intérêt, il permet de bloquer de façon comparable l'accessibilité de la streptavidine en cas d'interaction non spécifique de l'analyte sur la streptavidine, comme pour les fragments courts (Elmo $\Delta$ N et ElmoPH).

Lors des essais d'interaction par cette méthode avec les fragments courts, nous avons

remarqué que la protéine SH3<sub>1</sub> avait tendance à se fixer à la piste de référence de manière non spécifique empêchant toute analyse des données. Le pH du tampon de course dans lequel se fait l'expérience joue un rôle majeur dans les interactions non spécifiques. Une modification du pH pourrait permettre de les éviter. Nous avons donc préparé des échantillons protéiques de SH3<sub>1</sub> à différents pH (variant de 7 à 9). Les essais d'interaction avec ces différents échantillons de protéine ont montré qu'à pH 9 les interactions non spécifiques sur la piste de références sont diminuées mais pas totalement supprimées. Plusieurs cinétiques de titration en un seul cycle sont effectuées avec l'échantillon de protéine SH3<sub>1</sub> dans un tampon à pH9 mais les sensorgrammes enregistrés ne sont pas analysables. La ligne de base des différents sensorgrammes n'est pas stable, des pics anarchiques, un bruit de fond excessif et des variations de niveau sont observées.

Une seconde approche de couplage par la streptavidine est mise en place en utilisant la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA comme ligand.

#### (ii) La protéine SH3<sub>1</sub>-BirA utilisée comme ligand

Une surface est fonctionnalisée avec la protéine SH3<sub>1</sub>-BirA biotinylée à un niveau de 635 RU sur la piste 3 et 520 RU sur la piste 4. La piste 1 sert de référence avec de la streptavidine immobilisée dessus. La piste 2 sert de double référence avec de la streptavidine et du lysosyme biotinylé fixés comme décrit précédemment. Des cinétiques de titration en un seul cycle sont réalisées avec les protéines ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP. Deux gammes de cinq concentrations sont injectées (Tableau XXXIII).

	ElmoWT		Elmo $\Delta$ PxxP	
	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 1	Gamme 2
<b>Conc 1 (<math>\mu</math>M)</b>	0,1	3,22	0,1	3,3
<b>Conc 2 (<math>\mu</math>M)</b>	0,2	6,44	0,21	6,61
<b>Conc 3 (<math>\mu</math>M)</b>	0,4	12,88	0,41	13,23
<b>Conc 4 (<math>\mu</math>M)</b>	0,8	25,75	0,83	26,45
<b>Conc 5 (<math>\mu</math>M)</b>	1,61	51,5	1,6	52,9

**Tableau XXXIII : Gammes de concentration de ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP utilisées.**

Les réponses des sensorgrammes pour la gamme de concentration la plus faible pour les deux fragments sont très faibles et sont mélangées dans le bruit de fond, elles ne pourront pas être analysées. Les réponses pour les gammes plus concentrées en analyte ont, elles, un niveau de réponse tout à fait correct. Quelques sauts de réponses anarchiques sont observés,

ces zones ont donc été écartées pour ne pas être prises en compte lors du calcul des ajustements (Figure 81). Les pistes de référence 1 et 2 montrent une interaction non spécifique de l'analyte, nous utilisons la piste 2 comme référence pour nos courbes.

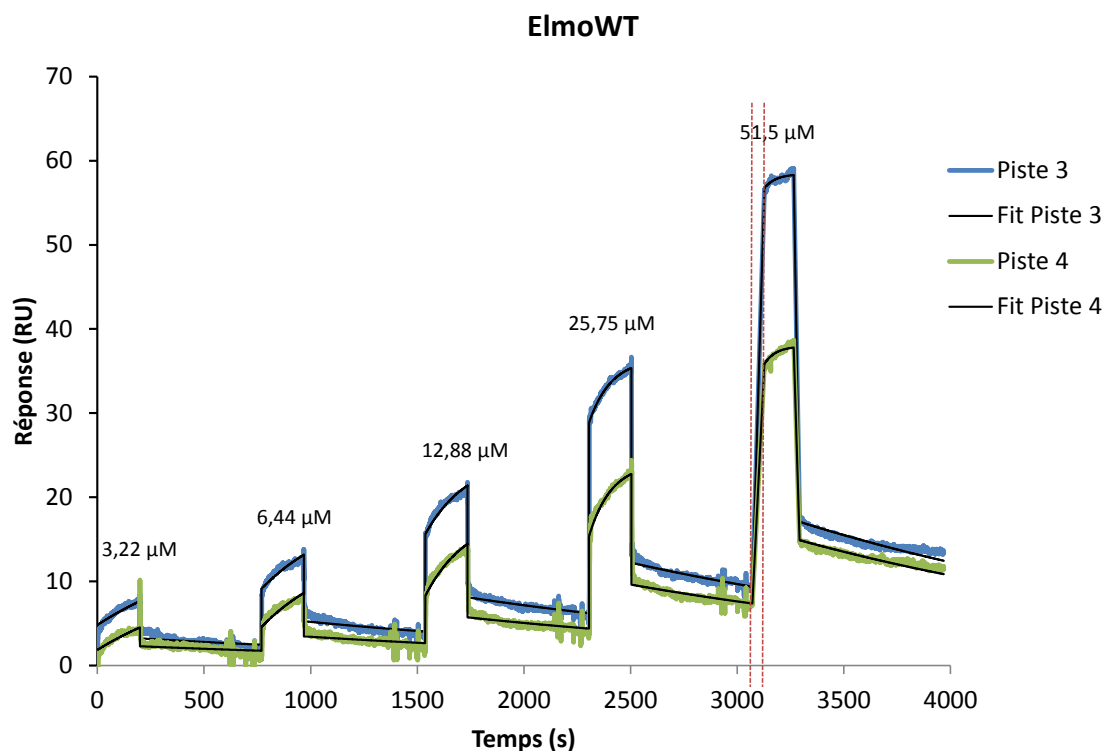
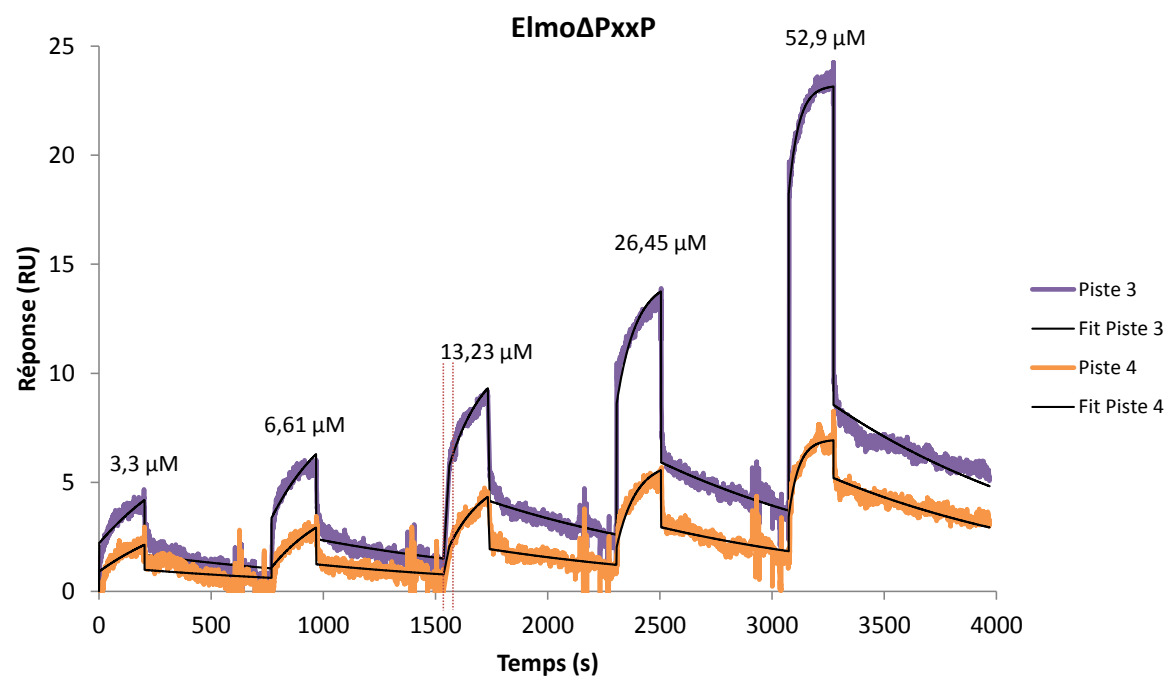
Nous avons analysé les cinétiques de titration avec le programme Fityk. Des modèles d'interaction 1 :1 et à deux ligands sont testés, le modèle à un seul ligand suffit à décrire correctement la cinétique, montrant que nous avons réussi à obtenir une homogénéité du ligand (Figure 81).

Nous pouvons remarquer que les niveaux de réponse sont beaucoup plus faibles que lors des expériences en couplage amine. La quantité de ligand immobilisée est effectivement deux fois plus faible, mais cela n'explique pas cet écart de réponse. En effet, ici, le ligand est orienté de façon à libérer son site d'interaction, toutes les molécules fixées devraient donc être fonctionnelles, alors que lors du couplage amine seulement une partie des ligands est orientée de la façon adéquate. Nous pouvons observer un deuxième phénomène surprenant, une réponse d'association et de dissociation très rapide que l'on ne peut pas mesurer. Ce phénomène fait penser à une très importante variation de l'indice de réfraction lors de l'injection de l'analyte ou une interaction non spécifique extrêmement rapide. Les constantes de cinétiques calculées d'après les ajustements sont résumées dans le Tableau XXXIV.

Les ajustements calculés semblent tout à fait raisonnables avec des  $\chi^2$  inférieur à 0,5. L'interaction est de l'ordre du micromolaire pour les deux fragments de Elmo1, 1  $\mu\text{M}$  pour l'interaction avec ElmoWT et 2  $\mu\text{M}$  pour celle avec le fragment Elmo $\Delta\text{PxxP}$ . Cette légère différence reflète une meilleure affinité du complexe lorsque le motif PxxP de Elmo1 est présent.

Les données de cinétique montrent que l'absence du motif PxxP (résidus 675 à 727) permet d'augmenter très légèrement la vitesse d'association du complexe  $k_a$ , passant d'un  $k_a$  de 355  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour la protéine entière ElmoWT à un  $k_a$  de 408  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour le fragment sans motif PxxP. L'absence du motif PxxP lors de l'interaction entraîne surtout une augmentation de près du double de la vitesse de dissociation de ce complexe  $k_d$ .



**A****B**

**Figure 81 : Analyse SPR de l'interaction des fragments ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP avec SH3<sub>1</sub>-BirA par cinétique de titration en un seul cycle.**

**A : ElmoWT. B : Elmo $\Delta$ PxxP.** Les zones entre les traits rouges correspondent aux pics anarchiques, elles n'ont pas été utilisées lors des calculs d'ajustement des courbes.

	<b>ElmoWT</b>	<b>ElmoΔPxxP</b>
<b>Chi<sup>2</sup></b>	0,47	0,25
<b>k<sub>a</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	354,58	407,50
<b>k<sub>d</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	0,47.10 <sup>-4</sup>	0,82.10 <sup>-4</sup>
<b>K<sub>D</sub> (M)</b>	1.10 <sup>-6</sup>	2.10 <sup>-6</sup>
<b>Temps de ½ vie (min)</b>	25	14

**Tableau XXXIV : Paramètres des cinétiques des ajustements par Fityk.**

L'association du motif PxxP avec le domaine SH3 de Dock1 met en jeu de nombreuses interactions. Comme le montre la structure code pdb 3A98 du complexe du fragment ElmoΔN avec le fragment SH3<sub>2</sub>-Hα, le motif PxxP vient s'enrouler tout autour du domaine SH3. Cette interaction longue à mettre en place, est par contre très stable. Le temps de demi-vie du complexe est calculé d'après l'équation :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{off}}$$

C'est ainsi que l'on peut observer que la durée de demi-vie du complexe ElmoWT/SH3<sub>1</sub> est plus longue que celle du complexe sans le motif PxxP.

### ***3) Analyse de l'interaction avec le fragment ElmoN***

Les données bibliographiques actuelles convergent toutes vers le fait que le domaine N-terminal de Elmo1 n'interagirait pas avec la protéine Dock1. La kinase Hck qui phosphoryle Elmo1 possède un domaine SH3 (en page 70). Les expériences de co-précipitation menées par Rida Awad dans l'équipe de Philippe Frachet sur l'interaction entre la protéine Elmo1 et la kinase Hck semblent montrer une interaction du domaine N-terminal de Elmo1 avec le domaine SH3 de Hck. Bien que ses expériences de co-précipitation ne révèlent pas d'interaction entre le domaine N-terminal de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock1, nous avons voulu tester cette interaction par SPR. En effet, contrairement à la SPR, la co-précipitation ne permet pas de mettre en évidence des interactions de faible affinité, supérieures au micromolaire.

#### ***(a) Analyse par couplage amine***

Une surface est fonctionnalisée par couplage amine avec la protéine SH3<sub>1</sub> à différents niveaux d'immobilisation (1650 RU sur la piste 2, 1070 RU sur la piste 3 et 2930 RU sur la

piste 4). Deux gammes de cinq concentrations croissantes de ElmoN sont injectées sur cette puce (Tableau XXXV).

	ElmoN	
	Gamme 1	Gamme 2
<b>Conc 1 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,21	6,76
<b>Conc 2 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,42	13,53
<b>Conc 3 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,85	27,05
<b>Conc 4 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	1,69	54,1
<b>Conc 5 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	3,38	108,2

**Tableau XXXV : Gammes de concentration de ElmoN utilisées.**

Les réponses obtenues lors de la cinétique de la gamme la plus faible en concentration sont trop faibles, elles s'assimilent au bruit de fond du sensorgramme. Par contre, les réponses pour la gamme plus concentrée en analyte sont correctes et montrent étonnement une interaction spécifique du fragment ElmoN sur la protéine SH3<sub>1</sub> immobilisée à la surface.

Les courbes obtenues n'ont pas pu être traitées car la soustraction de la réponse sur la piste de référence ne se fait pas correctement. Des portions de la courbe expérimentale ne semblent ne pas coïncider avec celles de la piste de référence malgré de nombreuses tentatives pour aligner les différentes pistes.

### ***(b) Analyse par couplage streptavidine***

Pour obtenir des données de cinétique sur cette surprenante interaction du fragment ElmoN, nous avons immobilisé par couplage streptavidine la protéine SH3<sub>1</sub> sur la puce à différents niveaux (640 RU sur la piste 3 et 520 RU sur la piste 4). Deux gammes de cinq concentrations croissantes de ElmoN sont injectées sur cette puce comme précédemment (Tableau XXXV). Une piste de référence contenant une protéine non relevante (le lysosyme biotinylé) fixé à de la streptavidine sera utilisée comme précédemment (en page 189).

Les réponses des sensorgrammes de la gamme de concentration la plus faible sont trop faibles et mélangées dans le bruit de fond, il n'est donc pas possible de les analyser. L'analyse de la gamme de forte concentration est par contre possible. Nous pouvons remarquer là aussi une interaction spécifique du fragment ElmoN avec le domaine SH3 de Dock1, les constantes de cinétiques sont rassemblées dans le Tableau XXXVI.

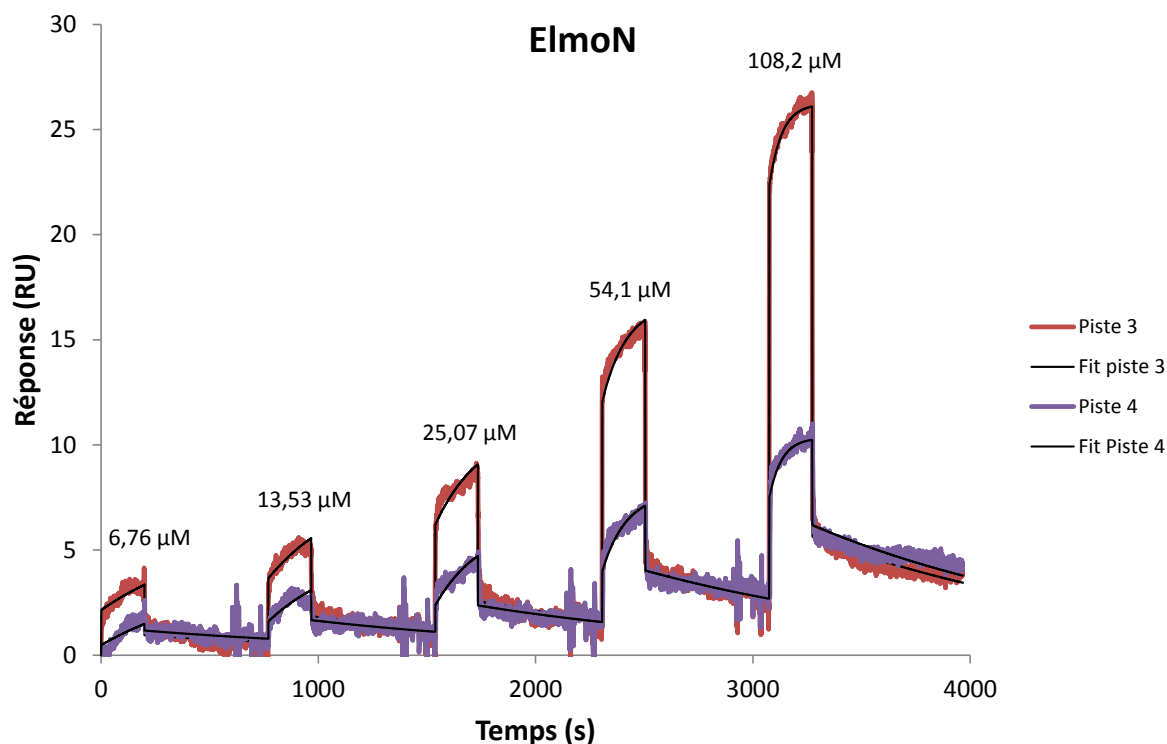


Figure 82 : Analyse SPR de l'interaction du fragment ElmoN avec SH3<sub>1</sub>-BirA par cinétique de titration en un seul cycle.

	<b>ElmoN</b>
<b>Chi<sup>2</sup></b>	0,32
<b>k<sub>a</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	1532,85
<b>k<sub>d</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	0,71.10 <sup>-4</sup>
<b>K<sub>D</sub> (M)</b>	0,5.10 <sup>-6</sup>
<b>Temps de ½ vie (min)</b>	16

Tableau XXXVI : Paramètres des cinétiques des ajustements par Fityk du fragment ElmoN.

Avec une constante d'affinité  $K_D$  de 0,5  $\mu\text{M}$  l'interaction de la région N-terminale de Elmo1 est faible. Cela pourrait expliquer qu'il n'a pas été possible de mettre cette interaction en évidence par co-précipitation auparavant. Ce complexe montre un temps de demi-vie de 16 minutes équivalent à celui retrouvé pour le fragment ElmoPxxP.

Les valeurs des constantes cinétiques pour les courbes d'interaction du fragment ElmoN, avec un  $\text{Chi}^2$  de 0,32, sont de la même qualité que celles décrivant l'interaction des fragments ElmoWT et Elmo $\Delta$ PxxP ( $\text{Chi}^2$  de 0,47 et 0,25). Toutefois, le caractère inédit de l'observation de cette interaction nous laisse perplexe quant à sa fiabilité.

#### ***4) Conclusion des données de SPR***

Tous les fragments de Elmo1 testés ont permis de mettre en évidence une interaction avec le domaine SH3 de Dock1. Cependant, les expériences réalisées avec les fragments courts de Elmo1 n'ont pas permis d'obtenir de données exploitables. L'instabilité de ces fragments et leur penchant pour l'agrégation en présence du domaine SH3 en sont probablement la cause.

Lors de nos expériences, nous avons rencontré des problèmes de régénération de la puce qui nous ont amené à utiliser la méthode de cinétique de titration en un seul cycle décrite récemment (Karlsson, Katsamba et al. 2006) en utilisant le programme d'ajustement de courbes Fityk.

Les études de SPR ont permis de déterminer les constantes de cinétique d'interaction avec le domaine SH3<sub>1</sub> de plusieurs fragments de Elmo1 (ElmoWT, ElmoΔC, ElmoΔPxxP et ElmoN). Nous avons obtenus des données sur la protéine entière ElmoWT par deux méthodes d'immobilisation du ligand (couplage amine et streptavidine). La méthode de couplage amine nous a amené à utiliser un modèle à double ligand pour calculer des ajustements. Les constantes d'association et de dissociation pour le premier ligand montrent une cinétique rapide. Les constantes pour le second ligand montrent une cinétique d'interaction plus lente, qui correspond aux valeurs de cinétique de ce même fragment déterminées par la méthode d'immobilisation par la streptavidine. Nous pouvons donc raisonnablement penser que l'interaction mise en évidence par la cinétique rapide pourrait correspondre à une orientation non adéquate du ligand, une agrégation des fragments de Elmo1 sur la puce ou une autre interaction spécifique ou non avec les constituants de la puce dont la nature reste encore à identifier. Les constantes pour le second ligand sont aussi cohérentes par rapport aux premières valeurs que nous avons déterminées par un couplage amine avec un modèle d'interaction 1 :1 dans les travaux de la publication (Sevajol, Reiser et al. 2012).

Les différentes constantes cinétiques des fragments étudiés sont rassemblées dans le Tableau XXXVII. Les données obtenues par couplage amine, analysées avec le modèle à double ligand, sont en accord avec les données du modèle simple ligand obtenu par couplage streptavidine. Cependant, le calcul des ajustements pour ces courbes n'est pas évident car il faut réussir à décomposer la contribution de chaque composante dans la cinétique globale. Nous avons d'ailleurs pu voir qu'il y avait une large plage de variation des paramètres cinétiques qui permettait de traduire la cinétique d'interaction, la précision de ces résultats n'est donc pas très bonne. Malgré la faiblesse du signal des expériences réalisées avec

l'immobilisation streptavidine, les résultats semblent plus fiables qu'avec l'immobilisation par couplage amine.

#### A : Couplage amine

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	Temps de $\frac{1}{2}$ vie (min)
<b>Elmo WT</b>	219	$3,57 \cdot 10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^{-6}$	32
<b>Elmo<math>\Delta</math>C</b>	466	$3,49 \cdot 10^{-4}$	$0,75 \cdot 10^{-6}$	33

#### B : Couplage streptavidine

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	Temps de $\frac{1}{2}$ vie (min)
<b>Elmo WT</b>	355	$0,47 \cdot 10^{-4}$	$1,32 \cdot 10^{-6}$	25
<b>Elmo<math>\Delta</math>PxxP</b>	407	$0,82 \cdot 10^{-4}$	$2,01 \cdot 10^{-6}$	14
<b>ElmoN</b>	1533	$0,71 \cdot 10^{-4}$	$0,46 \cdot 10^{-6}$	16

**Tableau XXXVII : Récapitulatif des constantes cinétiques des différents fragments de Elmo1.**

**A : Donnée obtenues par couplage amine. B : Données obtenues par couplage streptavidine.**

Les études *in vitro* sur l'interaction entre Elmo1 et Dock1 ont montré que la formation du complexe ne repose pas sur l'interaction du motif PxxP de Elmo1 avec le domaine SH3 de Dock (Komander, Patel et al. 2008). Cependant la présence de cette interaction a été démontrée comme cruciale à l'activité *in vivo* du complexe (Zhou, Caron et al. 2001; Komander, Patel et al. 2008).

Nos résultats permettent d'expliquer cette apparente contradiction. En effet, le motif PxxP n'est pas nécessaire à l'interaction, des formes tronquées de la région C-terminale de Elmo1 possèdent toujours la capacité d'interagir avec le domaine SH3 de Dock1. La structure du complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$  révèle en effet une interface de contact entre le domaine SH3 et les hélices  $\alpha$  encadrant le domaine PH, qui pourrait représenter l'interface minimale d'interaction. Toutefois, bien que la présence du motif PxxP de Elmo1 n'augmente pas significativement l'affinité des différents complexes testés, il permet d'en augmenter leur stabilité et leur durée de demi-vie. Cela laisse supposer un mécanisme d'interaction en deux temps avec tout d'abord une fixation rapide en mettant en jeu l'interaction des hélices  $\alpha$  encadrant le domaine PH de Elmo1. Puis dans un second temps la stabilisation de ce complexe par l'interaction du motif PxxP qui vient entourer le domaine SH3 de Dock1. Cette stabilisation permet de renforcer le complexe pour probablement permettre l'activation de la protéine Dock et faciliter le recrutement à la membrane.

Une des choses les plus surprenantes dans cette étude, a été la découverte d'une interaction entre la région N-terminale de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1. Toutefois, nous ne savons pas si cette interaction a une signification biologique dans le processus d'activation de la GTPase Rac1 ou si c'est un artefact dû à une construction de la protéine Elmo1 tronquée de sa région C-terminale. Une étude plus approfondie de cette interaction avec notamment une mise en évidence par d'autres techniques comme la RMN par exemple pourrait confirmer ou infirmer cette observation.

## III . Etude de la structure des protéines

Les études structurales de la protéine Elmo1 et du complexe avec Dock1, ont été au cœur de ma thèse. Nous avons voulu combiner les techniques de résolution de structure à haute résolution (cristallographie aux rayons X) avec les techniques de détermination d'enveloppe à basse résolution (SAXS). La complémentarité de ces deux techniques pourrait permettre d'obtenir de précieuses informations sur de possibles changements de conformation de la protéine Elmo1 en solution, ou lors de la formation de complexes.

Des premières données à basse résolution sur la protéine Elmo1 ont été obtenues. Par contre, l'absence de cristal de protéine ne nous a pas permis de réaliser une étude à haute résolution. Nous allons ici présenter la stratégie de cristallisation que nous avons mis en place ainsi que les données à basse résolution obtenues par SAXS.

### A . Essais de cristallisation

L'obtention d'un cristal de bonne qualité est souvent l'étape limitante d'une étude cristallographique de protéines. Nous avons dans un premier temps réalisé un criblage à grande échelle de différentes conditions de cristallisation. Comme cette méthode n'a pas permis d'obtenir de cristaux, nous avons ensuite testé des méthodes peu habituelles que nous allons ainsi décrire ici.

#### *1) Criblage à grande échelle*

##### *(a) Cristallisation de Elmo1*

Nous avons effectué des essais de cristallisation sur les différents fragments de Elmo1 produits (ElmoWT, Elmo $\Delta$ C, Elmo $\Delta$ PxxP, Elmo $\Delta$ N, ElmoPH, Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP et ElmoN). Le criblage des conditions de cristallisation a été réalisé grâce à la plateforme de cristallisation de l'EMBL HTXlab. Pour chacune des protéines, six plaques de 96 conditions sont testées à 20°C et à 4°C avec des échantillons protéiques à différentes concentrations (en page 125). Les essais sont réalisés à la fois avec des échantillons protéiques préparés dans du tampon contenant 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl et des échantillons protéiques dialysés contre un tampon contenant 20 mM Tris pH8 et 100 mM NaCl. Les essais sont aussi réalisés avec des protéines dont nous avons supprimé l'étiquette hexahistidine, qui pourrait par sa flexibilité réduire les chances de cristallisation.



Ces tests de cristallisation ont permis d'identifier plusieurs conditions différentes où des cristaux se sont formés. Un affinement de ces conditions au laboratoire a permis d'améliorer la taille de ces cristaux. La caractérisation de ces cristaux par diffraction des rayons X à l'ESRF nous a montré que tous ces cristaux n'étaient en fait que des cristaux de sels.

### ***(b) Cristallisation des complexes Elmo1/Dock1***

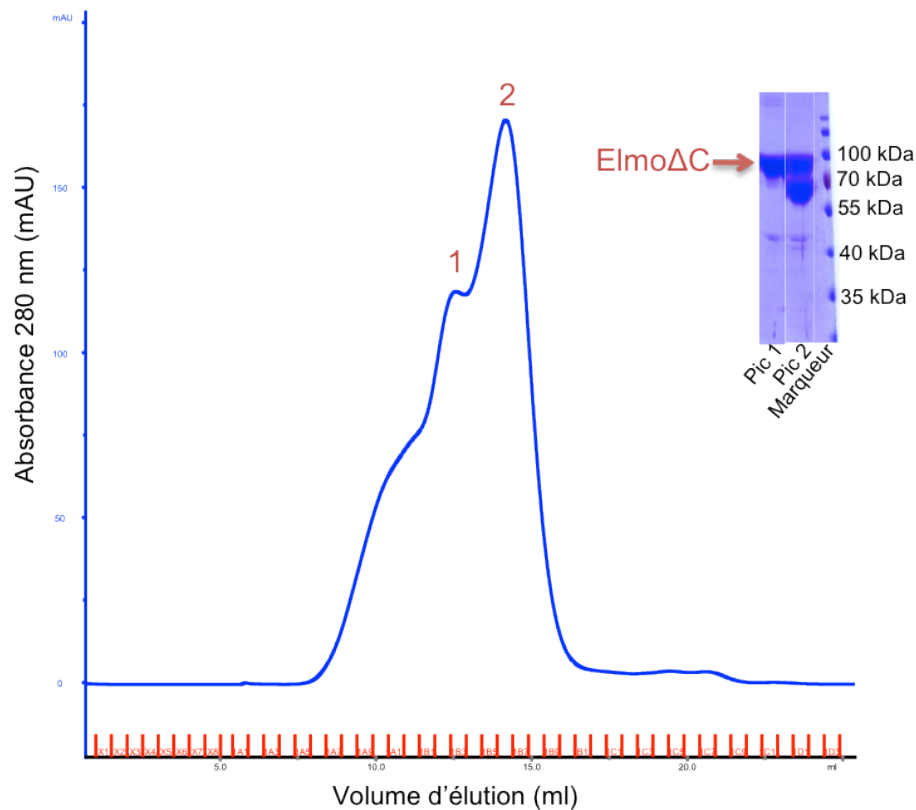
La même approche de cristallisation est réalisée pour tenter d'obtenir des cristaux de complexes Elmo1/Dock1. Nous avons testé la cristallisation des complexes ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ . Pour les complexes entre les fragments de Elmo1 et la protéine SH3<sub>1</sub>, les fragments ElmoWT et Elmo $\Delta$ N sont mélangés à un ratio molaire 1 :1 avec la protéine SH3<sub>1</sub> la veille des essais de cristallisation.

A l'heure actuelle, ces essais de cristallisation n'ont pas non plus permis d'obtenir de pistes exploitables de formation de cristaux de protéine.

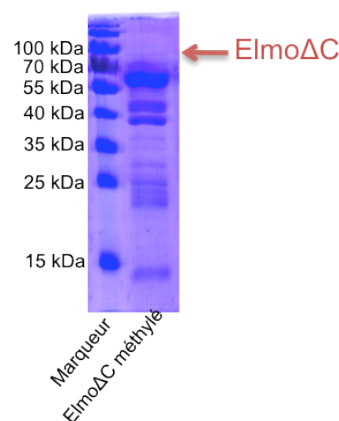
## **2) Méthylation chimique**

L'échec des techniques de cristallisation habituelles utilisées nous ont amené à chercher de nouvelles approches de cristallogénèse en général peu utilisées comme la méthylation chimique des lysines exposées au solvant (Walter, Meier et al. 2006). Nous avons testé cette technique sur la protéine entière ElmoWT et sur le fragment Elmo $\Delta$ C.

La réaction de méthylation a fait précipiter une importante partie des protéines Elmo $\Delta$ C, le profil d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille après la réaction montre un pic très étalé englobant le pic du monomère, celui du dimère ainsi que des dégradations et des agrégats de ce fragment (Figure 83). L'analyse par spectrométrie de masse d'une fraction de l'élution correspondant au monomère, une semaine après la méthylation, montre qu'il y a de nombreuses espèces présentes dans l'échantillon qui empêchent de vérifier si la méthylation des lysines a été efficace. Une analyse par SDS-PAGE confirme la présence de nombreuses espèces en solution, et montre que la protéine de départ Elmo $\Delta$ C n'est plus présente (Figure 84). Elle a peut-être subi une dégradation. A la vue de ces données, nous n'avons donc pas réalisé d'essais de cristallisation sur cet échantillon protéique.

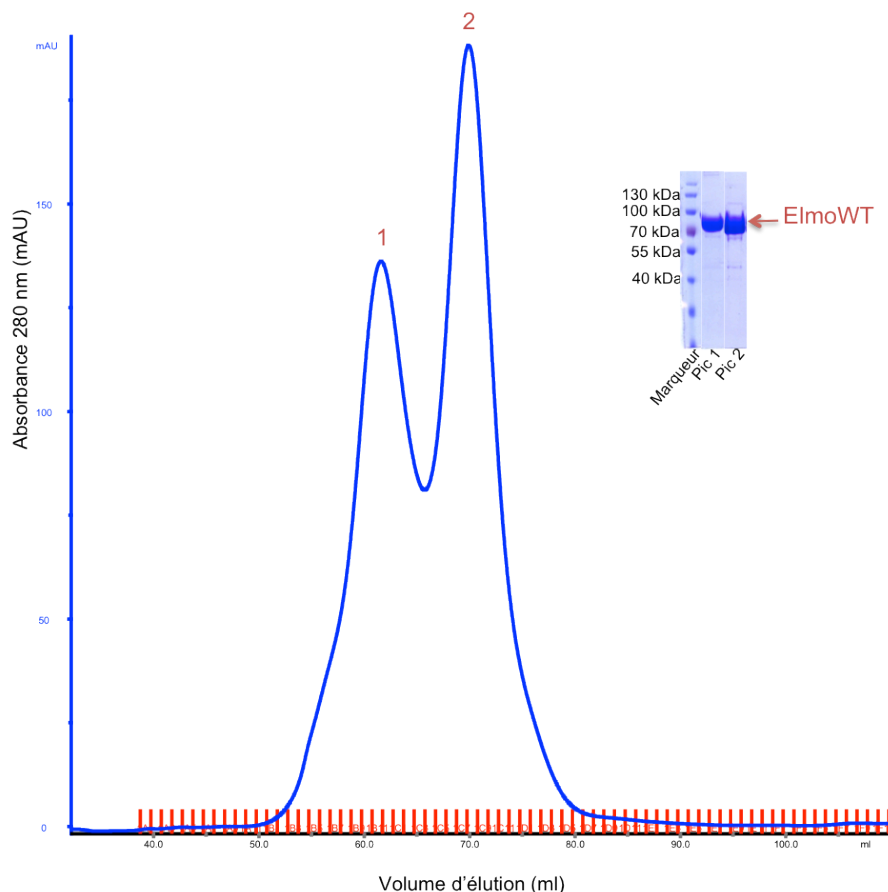


**Figure 83 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoΔC méthylé.**  
La protéine n'est plus homogène, il y a eu dégradation et agrégation. Colonne superdex 200 10/300.



**Figure 84 : SDS-PAGE du fragment ElmoΔC une semaine après sa méthylation.**  
La protéine native de 81 kDa a disparue, elle a été dégradée en fragments dont un de 60 kDa environ majoritaire.

Seulement une petite partie de l'échantillon protéique ElmoWT a précipité lors de la réaction de méthylation. La chromatographie d'exclusion de taille réalisée après la réaction de méthylation montre qu'il y a une proportion de dimère plus importante qu'habituellement lors de la purification de cette protéine (Figure 85). L'analyse SDS-PAGE montre que la protéine est pure, des essais de cristallisation ont pu donc être effectués.



**Figure 85 : Chromatographie d'exclusion de taille de ElmoWT méthylé.**  
**La protéine est éluée sous forme de monomère et de dimère.**

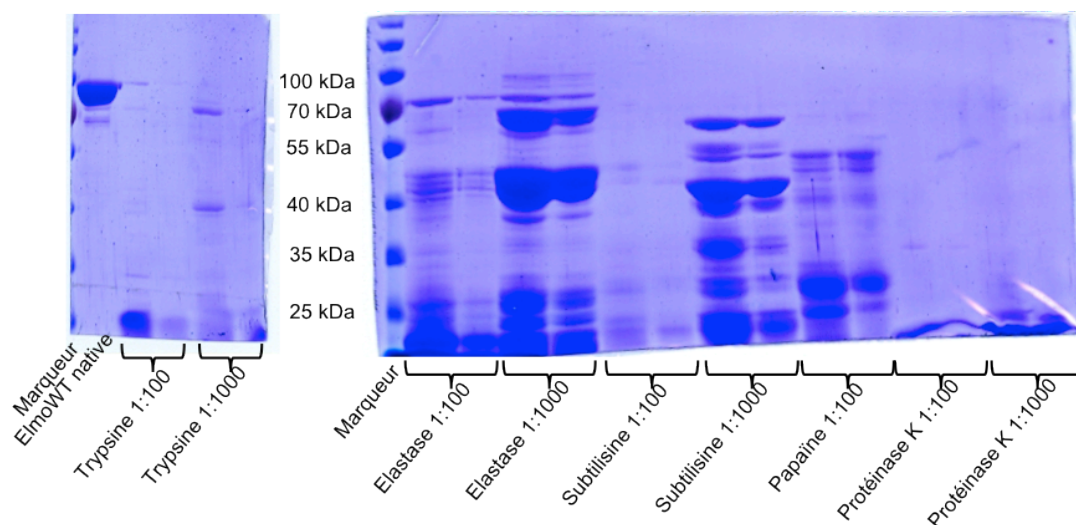
Ils ont été réalisés sur la plateforme de cristallisation HTXlab sur des échantillons de protéine sous forme de monomère mais aussi avec des échantillons où la protéine est sous forme de dimère. Ces tests n'ont pas permis d'obtenir de cristal de protéine.

### ***3) Protéolyse ménagée *in situ****

Une seconde approche récente qui permet d'augmenter les chances d'obtenir un cristal de protéine a été mise en place, il s'agit de la protéolyse ménagée *in situ* des protéines (Dong, Xu et al. 2007). Une très faible quantité de protéase est rajoutée dans la goutte de cristallisation, le but étant qu'une digestion des boucles et parties flexibles de la protéine d'intérêt pour ne laisser que les régions structurées et ainsi favoriser leur cristallisation.

Nous avons testé 5 protéases différentes (Trypsine, Elastase, Protéinase K, Papaïne et Subtilisine) ajoutées aux échantillons de la protéine ElmoWT à deux ratios massiques (1 :100 et 1 :1000). Les essais de cristallisation ont été réalisés sur la plateforme de cristallisation du HTXlab, en ajoutant la protéase à la solution de ElmoWT au tout dernier moment avant de former les gouttes de cristallisation. Malheureusement, les essais de cristallisation n'ont pas

permis d'obtenir de cristal de protéine. L'analyse de la digestion enzymatique est aussi analysée en parallèle par SDS-PAGE (Figure 86).



**Figure 86 : Analyse par SDS-PAGE des digestions enzymatiques de ElmoWT.**

Pour chaque enzyme deux quantités différentes de protéines sont déposées sur le gel. La Trypsine et la Protéinase K digèrent presque complètement ElmoWT. L'Elastase, la Subtilisine et la Papaïne réalisent une protéolyse limitée qui crée de nouveaux fragments de Elmo1.

Le ratio massique 1 :100 semble trop important pour toutes les protéases, la digestion est presque totale, ne laissant ainsi plus que des fragments peptidiques de petite taille. Il en est de même pour les digestions par la Trypsine et la Protéinase K au ratio 1 :1000. La digestion par la papaïne donne de nombreux fragments de plus grande taille. La digestion par l'Elastase et la Subtilisine permettent d'identifier chacune deux fragments de protéines de 45 et 60 kDa environ qui semblent stables à un ratio 1 :1000. Toutefois, une analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de déterminer la masse exacte et d'identifier la nature des domaines. Il serait intéressant d'essayer de les caractériser en faisant un séquençage N-terminal après séparation sur SDS-PAGE des différentes espèces. Ces fragments n'ont pas cristallisé dans le contexte de la protéolyse ménagée *in situ*, le fait d'être mélangés dans une solution contenant de nombreux autres fragments protéiques issus de la digestion enzymatique peut perturber la nucléation des protéines. Leur purification après digestion pourrait amener à de nouveaux essais de cristallisation.

Malheureusement et malgré plus de 15000 conditions de cristallisation testées en 4 ans, nous n'avons pas encore obtenu de cristal de protéine que ce soit seule ou en complexe avec un fragment de Dock1.

## **B . Localisation des domaines de Elmo1 par SAXS**

Au début de ma thèse, les données structurales sur la protéine Elmo1 se limitaient à la région C-terminale de la protéine, Elmo $\Delta$ N (Komander, Patel et al. 2008). Deux ans plus tard, la structure cristallographique du complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$  apporte de nouvelles informations sur ce domaine et la formation du complexe Elmo/Dock (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al. 2012). Aucune donnée sur la protéine Elmo1 entière n'est donc encore disponible. Nous allons ici tenter d'obtenir pour la première fois des informations sur la protéine Elmo1 entière.

La détermination par diffusion des rayons X aux petits angles de l'enveloppe globale de la protéine ElmoWT mais aussi de ses fragments (Elmo $\Delta$ C, ElmoN, Elmo $\Delta$ N et ElmoPH) devrait permettre de localiser les régions N et C-terminales.

### ***1) Détermination des paramètres structuraux***

Les protéines sont produites comme décrit précédemment (en page 101). Les fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille correspondant à la protéine monomérique sont regroupées et concentrées par centrifugation sur une membrane pour obtenir une gamme de concentration allant de 0,6 à 12,6 mg/ml (Tableau XXXVIII). Il est primordial d'utiliser des échantillons protéiques monodisperses dans des études de SAXS. Sachant que la concentration favorise la dimérisation des fragments de Elmo1 et leur agrégation, nous avons aussi utilisé pour certains fragments des échantillons issus directement des fractions d'élution sans étape de concentration. En parallèle des enregistrements de SAXS sur les échantillons de ElmoWT, de Elmo $\Delta$ N et de Elmo $\Delta$ C, Jean-Baptiste Reiser a réalisé une chromatographie d'exclusion de taille pour ces échantillons afin de vérifier leur état oligomérique au même moment de leur analyse par SAXS. Ces expériences semblent montrer que chacune des protéines est sous forme monomérique lors de l'enregistrement des données par SAXS.

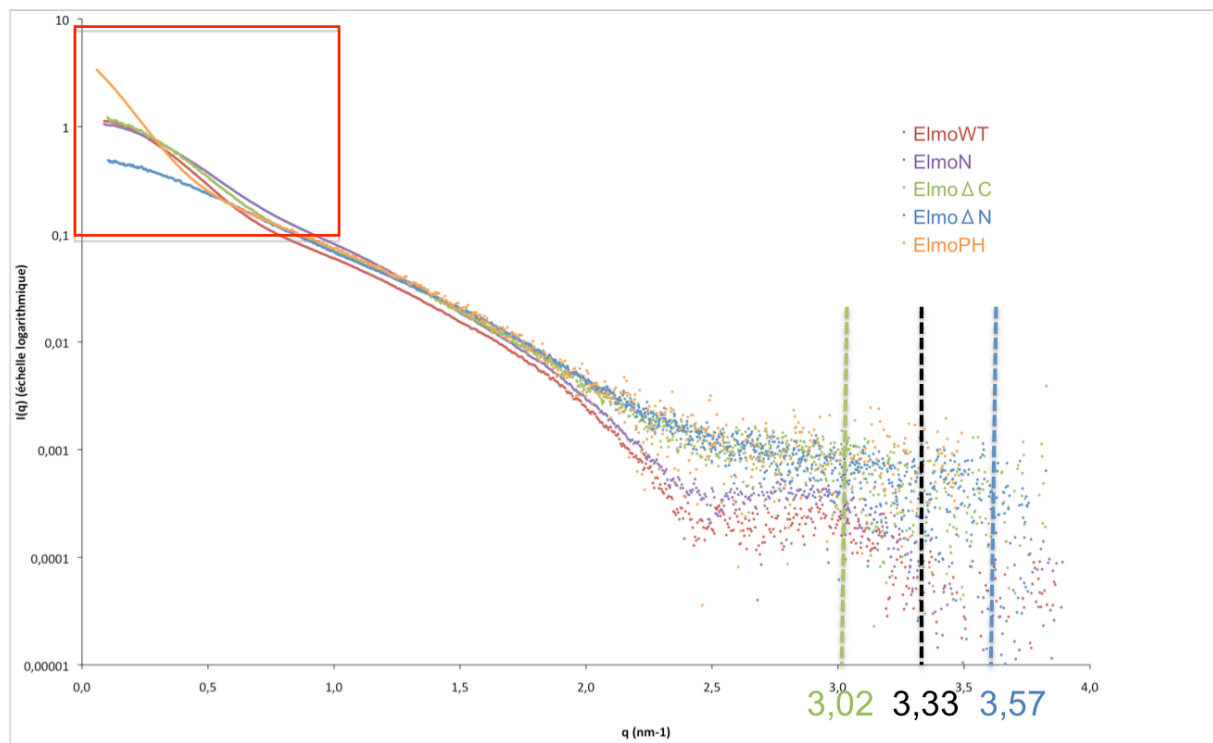
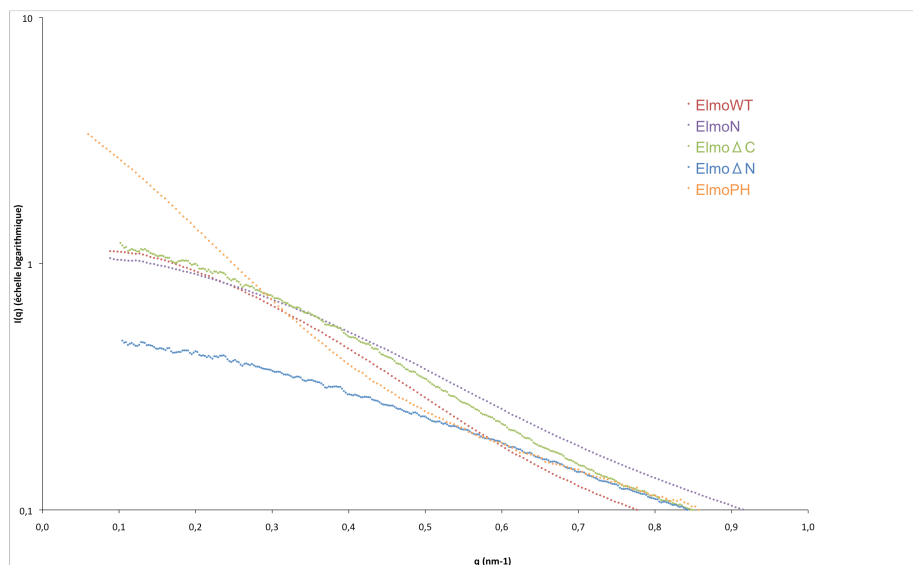
Protéine	ElmoWT 1-727	ElmoΔC 1-675	ElmoN 1-532	ElmoΔN 532-727	ElmoPH 532-675
Conc 1 (mg/ml)	0,6	1,6	0,9	3,2	1,4
Conc 2 (mg/ml)	1,5	2,6	2,1	3,4	1,6
Conc 3 (mg/ml)	3,1	4,7	3,6	4,7	3,2
Conc 4 (mg/ml)	5,9	-	5,5	9,6	6
Conc 5 (mg/ml)	12,6	-	10,5	-	9,6

**Tableau XXXVIII : Echantillons de protéine utilisés pour l'analyse SAXS.**

**Protéines solubilisées dans du tampon 25 mM Phosphate de sodium pH8, 100 mM NaCl.**

**Pour chaque échantillon protéique une gamme de plusieurs concentrations est utilisée. Les concentrations notées en bleu correspondent aux échantillons issus directement d'une fraction d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille.**

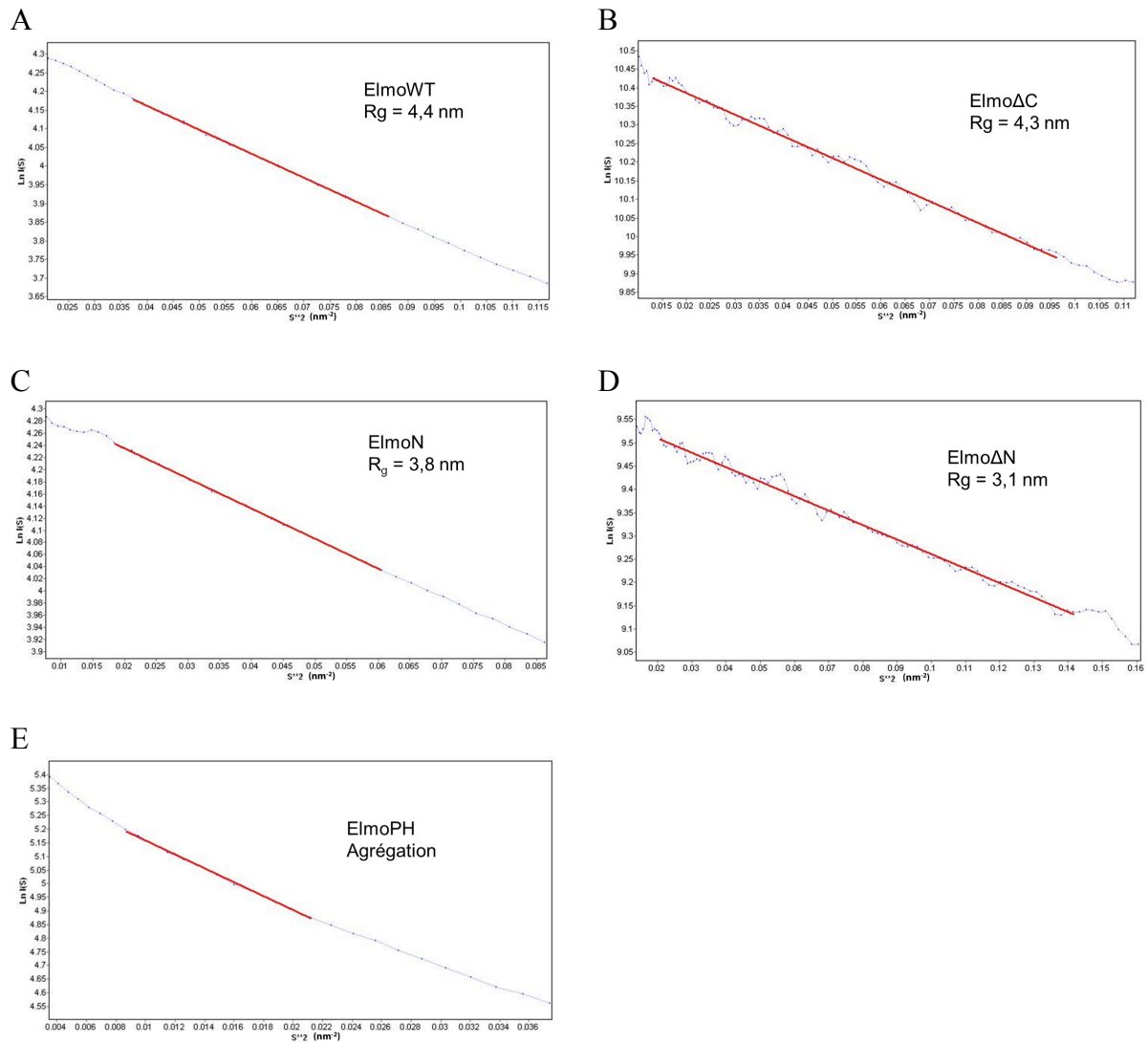
Les courbes de diffusion de chacun des échantillons de protéine sont enregistrées puis traitées et analysées comme décrit en page 133 (Figure 87). Une courbe « chimère » composée des données aux différentes concentrations est ainsi construite (en page 133). L'analyse de la courbe de Guinier dans la région des petits angles (Figure 88) permet d'extraire la valeur de l'intensité à l'origine ( $I(0)$ ) et le rayon de giration ( $R_g$ ) (Tableau XXXIX). La masse moléculaire des protéines en solution a été déterminée suite à une normalisation effectuée par l' $I(0)$  de la BSA (Tableau XXXIX). Tous les échantillons des fragments de Elmo1 ont pu être facilement analysés à l'exception du fragment ElmoPH. Il n'est pas possible de calculer le  $R_g$  de ce fragment ElmoPH car il montre une courbe de Guinier caractéristique d'un état d'agrégation (Figure 88). Les courbes de Kratky de chaque échantillon montrent que les fragments protéiques sont tous correctement repliés (Figure 89). La fonction de distribution des distances  $p(r)$  a été calculée avec le logiciel GNOM. Elle permet de déterminer la distance maximale de la protéine,  $D_{max}$  (Figure 90). Les valeurs sont rassemblées dans le Tableau XXXIX. L'allure de ces courbes est caractéristique de protéines asymétrique : la valeur de  $D_{max}/2$  est supérieure à la valeur du  $R_g$ , suggérant une forme allongée en solution.

**A****B**

**Figure 87 : Courbes de diffusion des protéines Elmo1.**

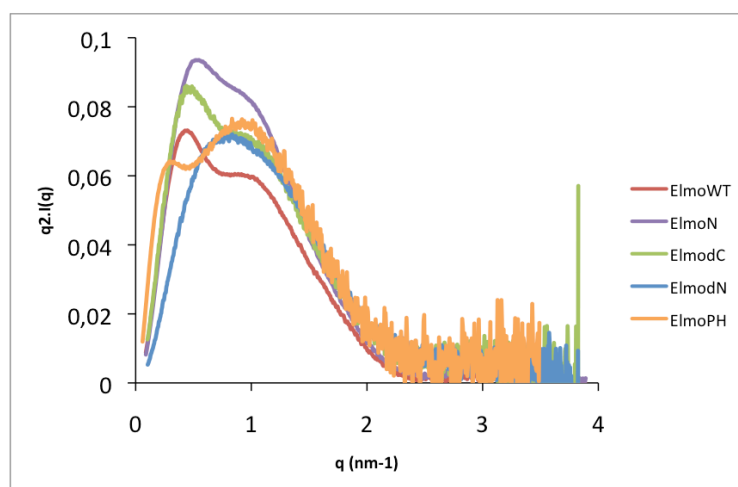
Les expériences n'ayant pas toutes été réalisées le même jour, le flux de photon a varié entre les différents enregistrements. Les courbes présentées sont donc normalisées par rapport à l'intensité de la BSA.

**A :** Courbes de diffusion dans toute la gamme de  $q$ . La limite de résolution utilisée est marquée par un trait en pointillés, vert pour Elmo $\Delta$ C, bleu pour Elmo $\Delta$ N et noir pour ElmoWT et ElmoN. L'agrandissement de la zone des petits angles est défini dans un cadre rouge. **B :** Agrandissement des courbes de diffusion aux plus petits angles. L'intensité à l'origine est proportionnelle à la masse molaire des fragments sauf pour la plus petite protéine ElmoPH qui a la plus forte intensité à l'origine. Les autres courbes respectent bien cette caractéristique. On peut remarquer que le signal des courbes des fragments Elmo $\Delta$ C et Elmo $\Delta$ N est plus « bruité ».



**Figure 88 : Courbes de Guinier des fragments protéiques de Elmo1.**

**A : ElmoWT. B : Elmo $\Delta$ C. C : ElmoN. D : Elmo $\Delta$ N. E : ElmoPH, la zone linéaire s'étend sur trop peu de distance, ce qui montre un état d'agrégation de la protéine.**



**Figure 89 : Courbe de Kratky des différentes protéines Elmo1.**

**Toutes les courbes sont caractéristiques de protéines bien repliées (en page 134).**



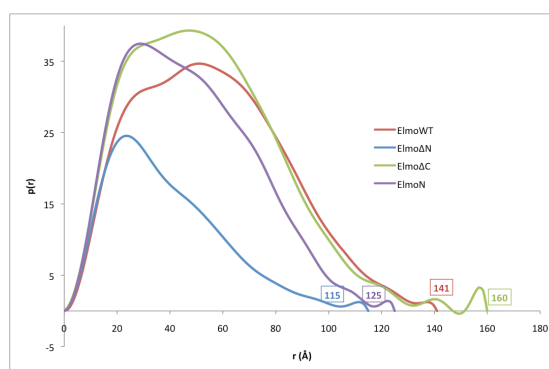


Figure 90 : Fonction de distribution des distances.

Superposition des courbes des protéines ElmoWT (en rouge), ElmoΔN (en bleu), ElmoΔC (en vert) et ElmoN (en violet). La valeur  $D_{\max}$  de chaque protéine est indiquée dans la couleur correspondante pour chaque courbe. Les ondulations dans la région de  $D_{\max}$  de la protéine ElmoΔC sont liées à des artefacts liés à des problèmes de traitement des données. Toutes ces courbes sont caractéristiques d'une protéine allongée.

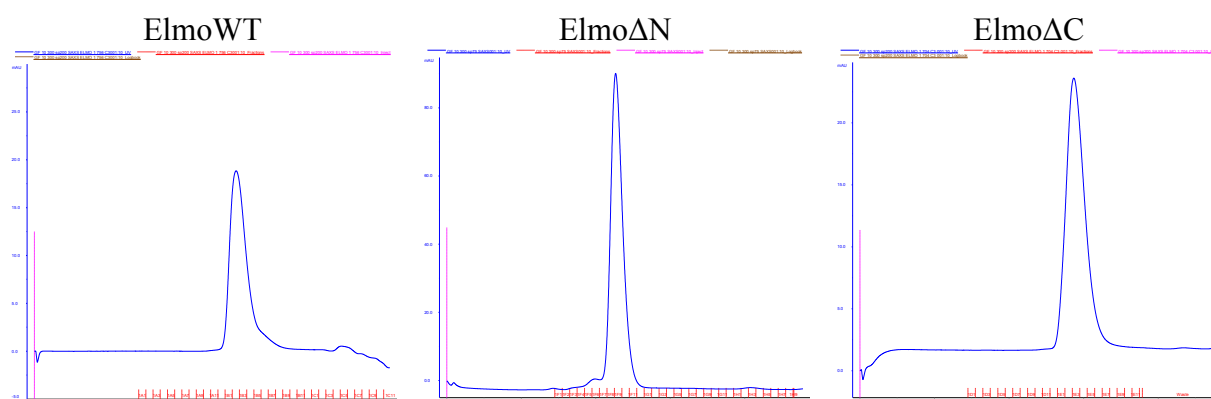
	Masse théorique (kDa)	Masse calculée (kDa)	Rg (nm) Guinier	Dmax (nm)
ElmoWT	87,4	90	4,4	14,1
ElmoΔC	81,4	82	4,3	16
ElmoN	64,7	74	3,8	12,5
ElmoΔN	26,2	33	3,1	11,5

Tableau XXXIX : Paramètres structuraux des différentes constructions de Elmo1 par SAXS.

Les masses molaires obtenues par ses observations SAXS pour les fragments ElmoWT, ElmoΔC et ElmoN sont proches des masses théoriques ; il est à noter toutefois une masse légèrement supérieure pour ElmoN mais qui reste en accord avec la masse déterminée par SEC-MALLS par Rida Awad (78kDa). Les rayons de giration augmentent bien en fonction de la masse. Par contre, et étonnamment, la valeur  $D_{\max}$  pour la protéine ElmoΔC de 16 nm est bien supérieure à celle de la protéine entière, 14,1 nm. En observant la courbe de distribution des distances (Figure 90) nous pouvons apercevoir que celle-ci fait des oscillations dans la zone des plus grandes distances, entraînant ainsi une certaine incertitude sur la  $D_{\max}$  réelle. Les données enregistrées sur ce fragment (Figure 87) sont de moins bonne qualité que pour les autres fragments, la courbe de diffusion est beaucoup plus bruitée.

La comparaison des différents paramètres structuraux montre une certaine ambiguïté sur le fragment ElmoΔN. En effet, les paramètres de cette protéine paraissent trop élevés en comparaison avec les autres protéines. Ce fragment est environ trois fois plus petit que la protéine entière ElmoWT mais son  $R_g$  et sa  $D_{\max}$  ne sont inférieurs que de 25 % environ. La masse calculée de ce fragment, 33 kDa, est aussi supérieure à la masse théorique. Mais la courbe de Guinier de ce fragment ne montre pas d'agrégation. L'intensité mesurée représente

la moyenne de toutes les molécules en solution, un mélange monomère/dimère donnera une valeur de  $R_g$  moyenne entre les deux espèces et pourrait expliquer ces différences. On peut alors se demander s'il n'y a pas eu de formation de dimère en solution lors de l'enregistrement des données SAXS. Cependant, la chromatographie d'exclusion de taille réalisée au laboratoire sur un aliquot de cet échantillon protéique au même moment où l'enregistrement de SAXS montre bien que les échantillons sont monodisperses (Figure 91). De plus, le volume d'élution correspond au volume d'élution d'un monomère confirmé par des expériences de SEC-MALLS.



**Figure 91 : Chromatographie d'exclusion de taille des protéines Elmo1.**  
Les différentes chromatographies montrent des échantillons monodisperses de forme monomérique. Colonne superdex 75 10/300.

## ***2) Modélisation ab initio***

Afin de calculer une enveloppe à basse résolution de chacune de ces protéines Elmo1, nous avons utilisé le programme DAMMIF. Ce programme représente la protéine comme une suite de billes positionnées selon un réseau hexagonal compact et utilise une méthode de recuit simulé pour construire un modèle compatible avec les données de la courbe expérimentale de diffusion, sous des contraintes assurant la connectivité et la compacité du modèle.

Nous avons réalisé 40 modèles indépendants avec le programme DAMMIF pour chaque fragment. Les modèles obtenus forment un ensemble d'enveloppes qui vont être comparées, moyennées et filtrées avec le programme DAMAVER (Volkov and Svergun 2003). DAMAVER détermine la valeur d'une pseudo-distance dite « Normalized spatial Discrepancy » (NSD) entre les modèles qui est utilisée pour mesurer le degré de similarité entre les modèles. Lorsque les modèles sont similaires, la valeur de NSD est proche ou inférieure à 1 (Tableau XL). Pour chacune des protéines étudiées, les valeurs de NSD sont inférieures à 1 et ne varient que très peu indiquant une excellente corrélation, seulement un

faible nombre de modèles ont dû être écartés. En effet, chaque modèle de DAMMIF pris individuellement présente des différences, mais l'allure générale de ces modèles, donnée dans le modèle moyen filtré, nous indique l'allure générale de la protéine (Figure 92).

	NSD moyen	Variation du NSD	Nombre de modèles écartés
<b>ElmoWT</b>	0,89	$\pm 0,067$	1
<b>Elmo<math>\Delta</math>C</b>	0,808	$\pm 0,071$	3
<b>ElmoN</b>	0,738	$\pm 0,067$	1
<b>Elmo<math>\Delta</math>N</b>	0,573	$\pm 0,027$	3

Tableau XL : Comparaison par le programme DAMAVER des différents modèles calculés.

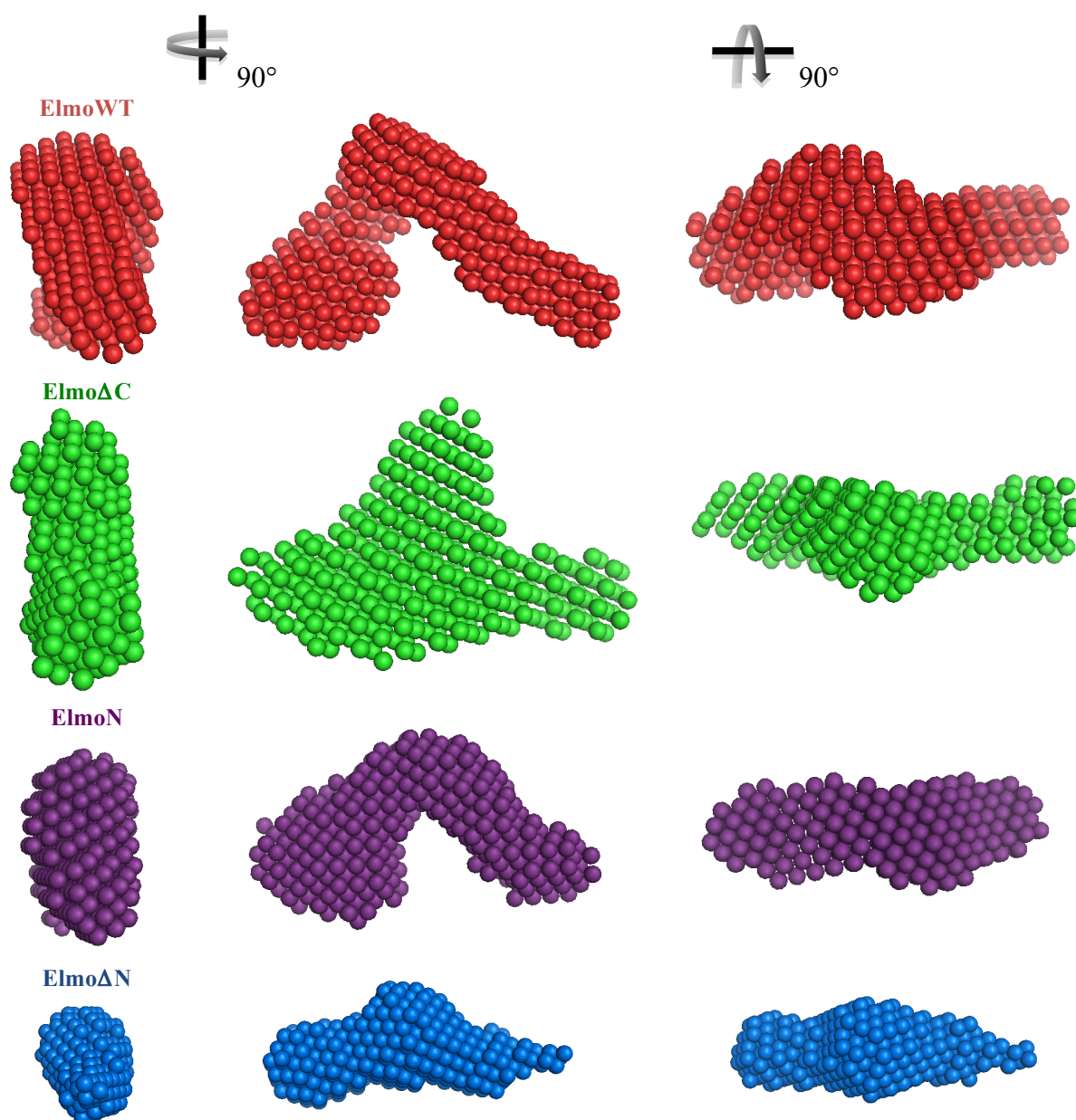
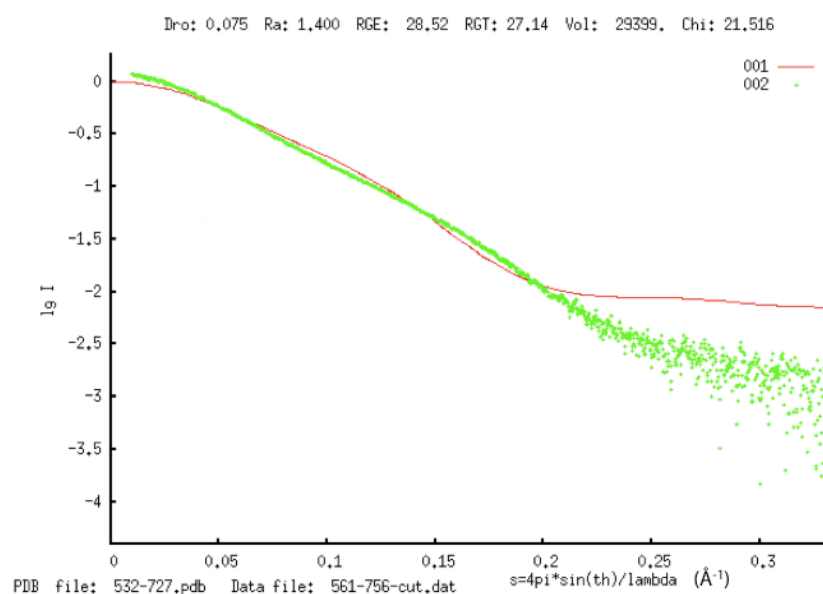


Figure 92 : Moyenne des modèles filtrés par DAMMIF des différents fragments de Elmo1.

Trois vues à un angle de 90°. La protéine ElmoWT est en rouge, le fragment Elmo $\Delta$ C en vert, le fragment ElmoN en violet et le fragment Elmo $\Delta$ N en bleu. Les modèles sont à l'échelle.

### 3) *L'ambiguïté du fragment ElmoΔN*

Grâce au programme CRY SOL, nous avons calculé une courbe de diffusion théorique du fragment ElmoΔN à partir de sa structure atomique (code pdb 3A98) pour la comparer avec la courbe de diffusion expérimentale de ce même fragment (Figure 93). En observant la superposition des deux courbes, elles ne concordent pas, la valeur du Chi est assez élevée, supérieure à 20. Cette différence pourrait être due à une conformation différente en solution et dans le cristal, mais aussi à un état oligomérique différent.



**Figure 93 : Résultat CRY SOL pour le fragment ElmoΔN.**

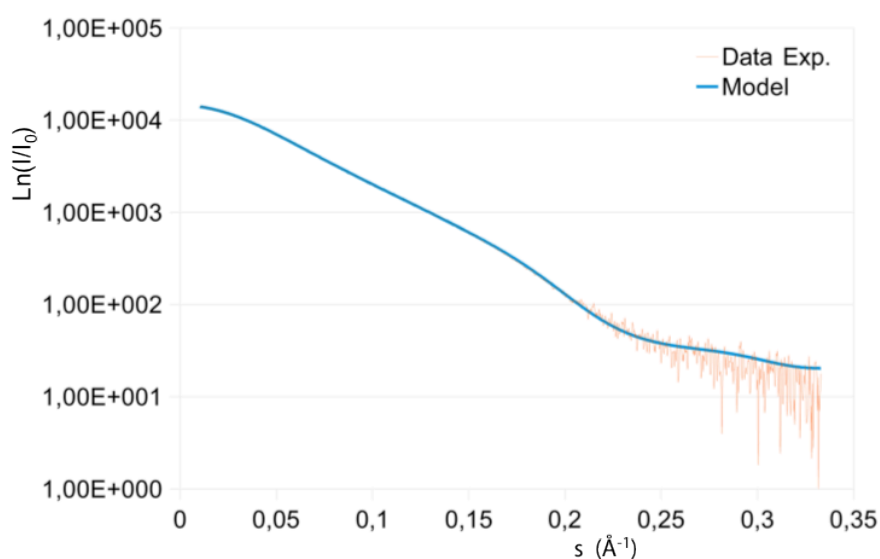
La courbe expérimentale en vert est superposée à la courbe de diffusion théorique en rouge du fragment ElmoΔN d'après la structure cristalline (code pdb 3A98). La valeur du Chi est de 21,516, ce qui est très élevé et montre donc la discordance entre les données de SAXS et le modèle de monomère théorique.

Le  $R_g$  du fragment ElmoΔN calculé d'après la courbe théorique issue de la structure cristalline est d'environ 2 nm, alors que celui du modèle SAXS est de 3,1 nm. Les fragments de Elmo1 ont tendance à dimériser, cela pourrait expliquer les valeurs observées par SAXS.

Bien que la chromatographie d'exclusion de taille que nous avons réalisée en parallèle des expériences nous suggère la présence d'un monomère, plusieurs données montrent la capacité de ce fragment à former des dimères. En effet, lors de sa purification nous avons pu voir qu'il formait des dimères en solution. De plus, la structure cristalline du domaine seul (code PDB 2VSZ) montre un empilement cristallin avec un assemblage de dimères (Komander, Patel et al. 2008). L'oligomérisation de ce fragment n'est donc pas à exclure.

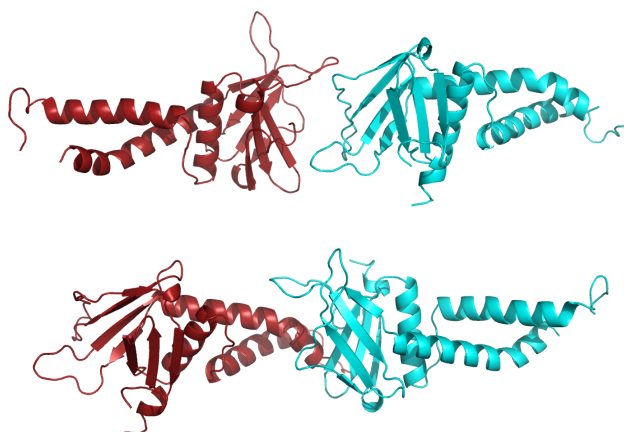
Nous avons donc testé la présence d'un dimère grâce au programme SASREF qui permet de modéliser l'orientation relative et la position de deux protéines qui concordent le mieux avec les données expérimentales de SAXS. Nous avons pour cela utilisé la structure

atomique du fragment Elmo $\Delta$ PxxP (532-707) qui ne contient pas le motif PxxP (code PDB 3A98). En l'absence d'interaction avec un domaine SH3, le motif PxxP semble s'apparenter à une boucle flexible. Il est donc préférable d'exclure cette région du modèle plutôt que d'introduire une structure secondaire incorrecte. Dans un premier temps, des calculs ont été effectués sans contrainte de symétrie. Tous les modèles obtenus donnent des courbes de diffusion très proches de la courbe expérimentale, avec un Chi autour de 2,2 ils sont bien meilleurs que le modèle avec un monomère (Figure 94). Toutefois différents modes de dimérisation ont pu être modélisés.



**Figure 94 : Résultat de SASREF sans symétrie.**

Superposition de la courbe expérimentale du fragment Elmo $\Delta$ N en rouge avec la courbe du modèle de SASREF en bleu contenant un dimère.

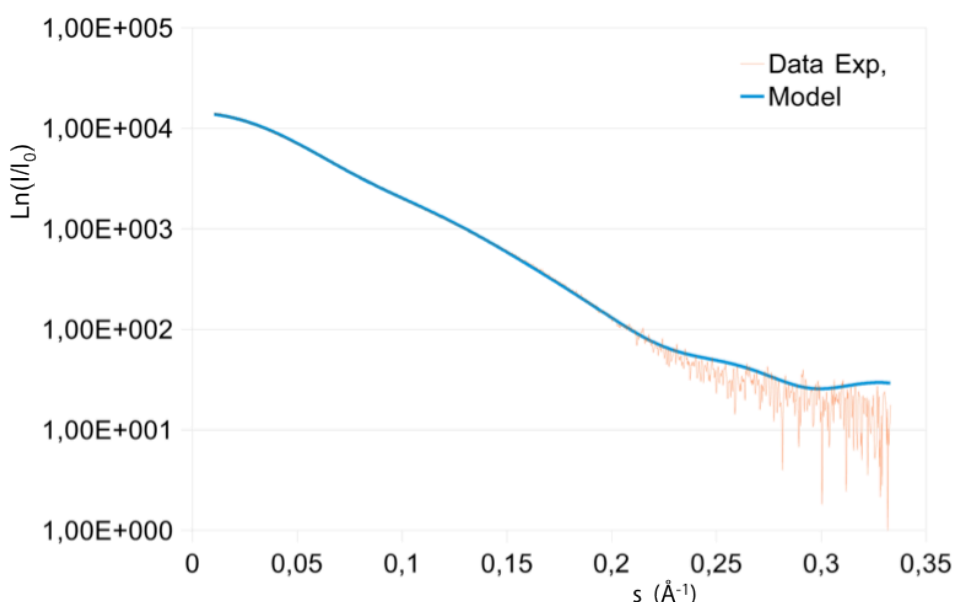


**Figure 95 : Deux exemples de mode de dimérisation des fragments Elmo $\Delta$ N obtenus par SASREF sans symétrie.**

Dans un deuxième temps, une symétrie C2 a été imposée pour la dimérisation du fragment. En effet, la très grande majorité des protéines qui dimérisent le font selon un axe de symétrie d'ordre 2 et les modèles précédents sans symétries sont compatibles avec la formation d'oligomères que nous n'observons pas. L'axe de symétrie empêche ainsi un enchainement d'interactions menant à la formation de multimères et donc d'agrégats.

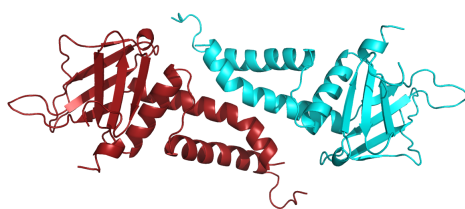
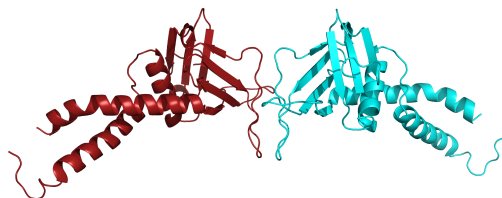
Nous avons réalisé 24 fois le calcul de modèles avec cet axe de symétrie (Figure 96). Les résultats montrent deux modes de dimérisation privilégiés (Figure 97), un premier qui met en jeu une interaction via les hélices  $\alpha$  sortantes (N $\alpha$ h et C $\alpha$ h), et un deuxième qui interagit par l'intermédiaire des domaines PH. Le premier modèle a été retrouvé dans la majorité des solutions de SASREF (16 modèles) avec un Chi qui varie de 3,11 à 3,18 alors que le Chi des modèles minoritaires mettant en interaction les domaines PH est meilleur avec des valeurs de chi qui varient entre 2,23 et 2,36.

Bien que le Chi moyen de ces modèles avec symétrie soit légèrement supérieur à ceux sans symétrie, il est bien plus probable que les modèles avec symétrie se retrouvent dans le cas de protéines en solution. Par contre à l'heure actuelle il n'est pas encore possible de déterminer quel est le mode dimérisation privilégié de ce fragment.



**Figure 96 : Résultat de SASREF avec symétrie C2.**

**Superposition de la courbe expérimentale du fragment Elmo $\Delta$ N en rouge avec une courbe du modèle de SASREF en bleu contenant un dimère.**

**A****B**

**Figure 97 : Modèle des deux modes de dimérisation de SASREF avec symétrie P2.**

**A : Interaction médiée par les hélices  $\alpha$  sortantes. B : Interaction médiée par le domaine PH.**

Ces données suggèrent donc la présence d'un dimère en solution. Pour vérifier si l'échantillon protéique analysé contient un mélange de monomère et de dimère et déterminer leur proportion nous avons utilisé le programme OLIGOMER. Les calculs sont réalisés à partir de la courbe expérimentale de diffusion du fragment Elmo $\Delta$ N, de la structure atomique du monomère et d'un modèle atomique de structure du dimère issu du programme SASREF. Le programme montre ainsi qu'il n'y aurait en solution qu'une seule espèce, le dimère Elmo $\Delta$ N.

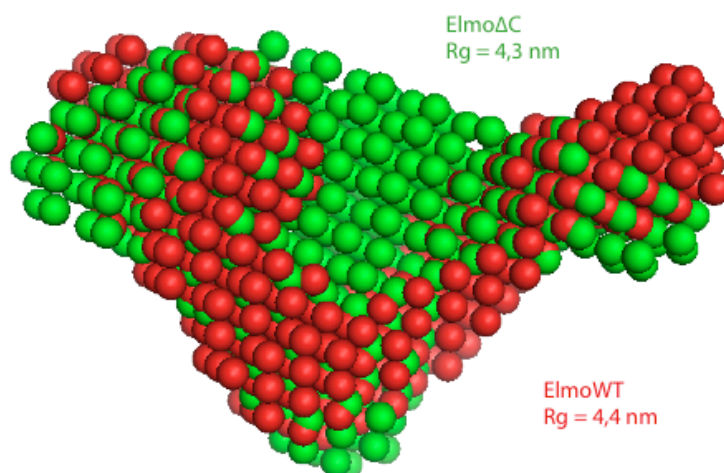
#### ***4) Superposition des différents modèles de Elmo1***

Grâce à l'ensemble des données SAXS, nous disposons de modèles d'enveloppe à basse résolution pour la protéine entière ElmoWT, le fragment Elmo $\Delta$ C et la région N-terminale ElmoN. La superposition de ces trois modèles pourrait permettre de localiser les régions N et C-terminales dans l'enveloppe de la protéine entière.

Le programme SUPCOMB nous permet de trouver la meilleure superposition de deux modèles. Nous l'avons utilisé dans un premier temps pour superposer les modèles des protéines ElmoWT et Elmo $\Delta$ C (Figure 98). Les deux protéines ont effectivement la même enveloppe globale mais on s'aperçoit que l'enveloppe de la protéine Elmo $\Delta$ C est plus massive, elle ne permet pas par exemple de visualiser la poche présente dans le modèle de la protéine ElmoWT. Nous ne pouvons pas non plus conclure quant à la localisation de la région 675-727 manquante dans la protéine Elmo $\Delta$ C. Nous avons vu plus tôt que les données enregistrées pour la protéine Elmo $\Delta$ C sont de moins bonne qualité que celles de la protéine ElmoWT, les différences que nous pouvons observer entre ces deux modèles sont

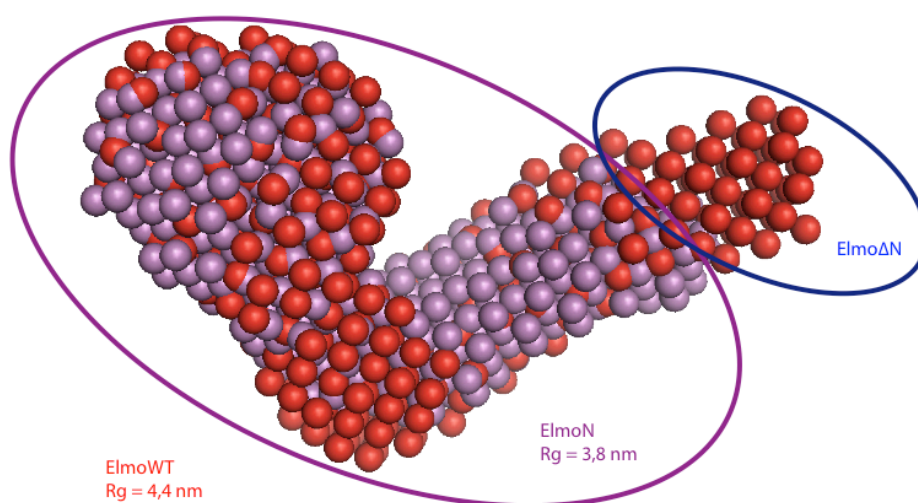


certainement le résultat de cette différence de qualité des données SAXS.



**Figure 98 :** Superposition des modèles des protéines ElmoWT en rouge et ElmoΔC en vert par le programme SUPCOMB.

Dans un deuxième temps, nous avons superposé les modèles des protéines ElmoWT et de ElmoN, pour permettre notamment de localiser la région N-terminale de Elmo1 dans le modèle de ElmoWT. La qualité des données de ces deux modèles est comparable. La superposition des deux protéines est de qualité satisfaisante et ne semble pas montrer d'ambiguïté, bien que proportionnellement, la taille de la région ElmoΔN manquante paraisse plus petite que la taille attendue (Figure 99). Elle permet notamment d'identifier l'emplacement probable de la région C-terminale de Elmo1 (ElmoΔN) comprenant le domaine PH et le motif PxxP.



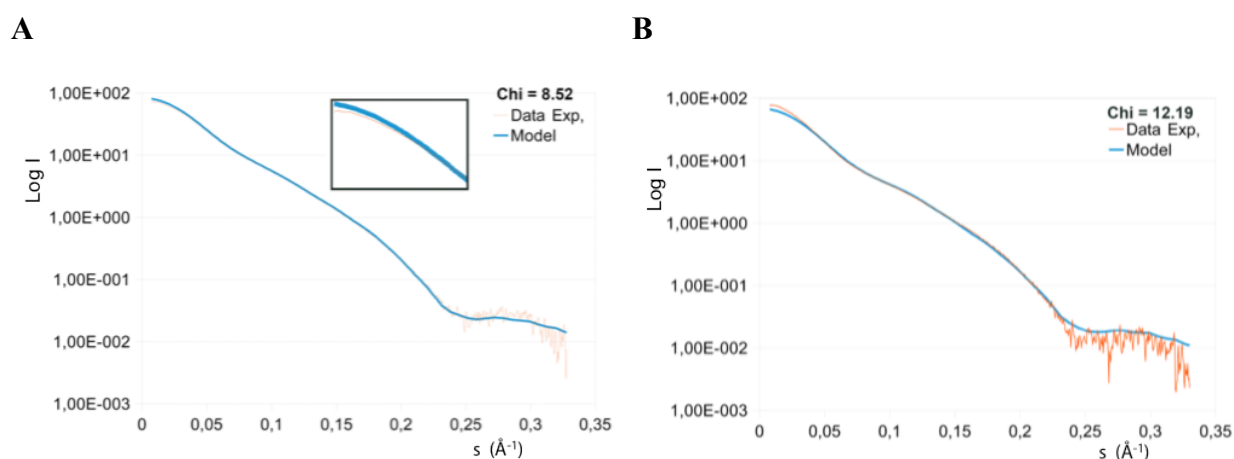
**Figure 99 :** Superposition des modèles des protéines ElmoWT en rouge et ElmoN en violet par le programme SUPCOMB. L'emplacement supposé du fragment ElmoΔN est marqué avec un cercle bleu.



### 5) Reconstruction des domaines manquants à partir d'un domaine connu

Le programme BUNCH nous permet de créer un modèle complet à partir de la structure atomique du fragment Elmo $\Delta$ N en lui imposant d'être cohérent avec la courbe de diffusion expérimentale de la protéine entière ElmoWT. Il va ainsi reconstruire toute la région N-terminale manquante de ElmoWT. Ayant une courbe de diffusion représentative de cette région N-terminale (grâce au fragment ElmoN), nous imposons au programme BUNCH que le modèle de la région N-terminale qu'il construit soit aussi cohérent avec cette courbe de diffusion.

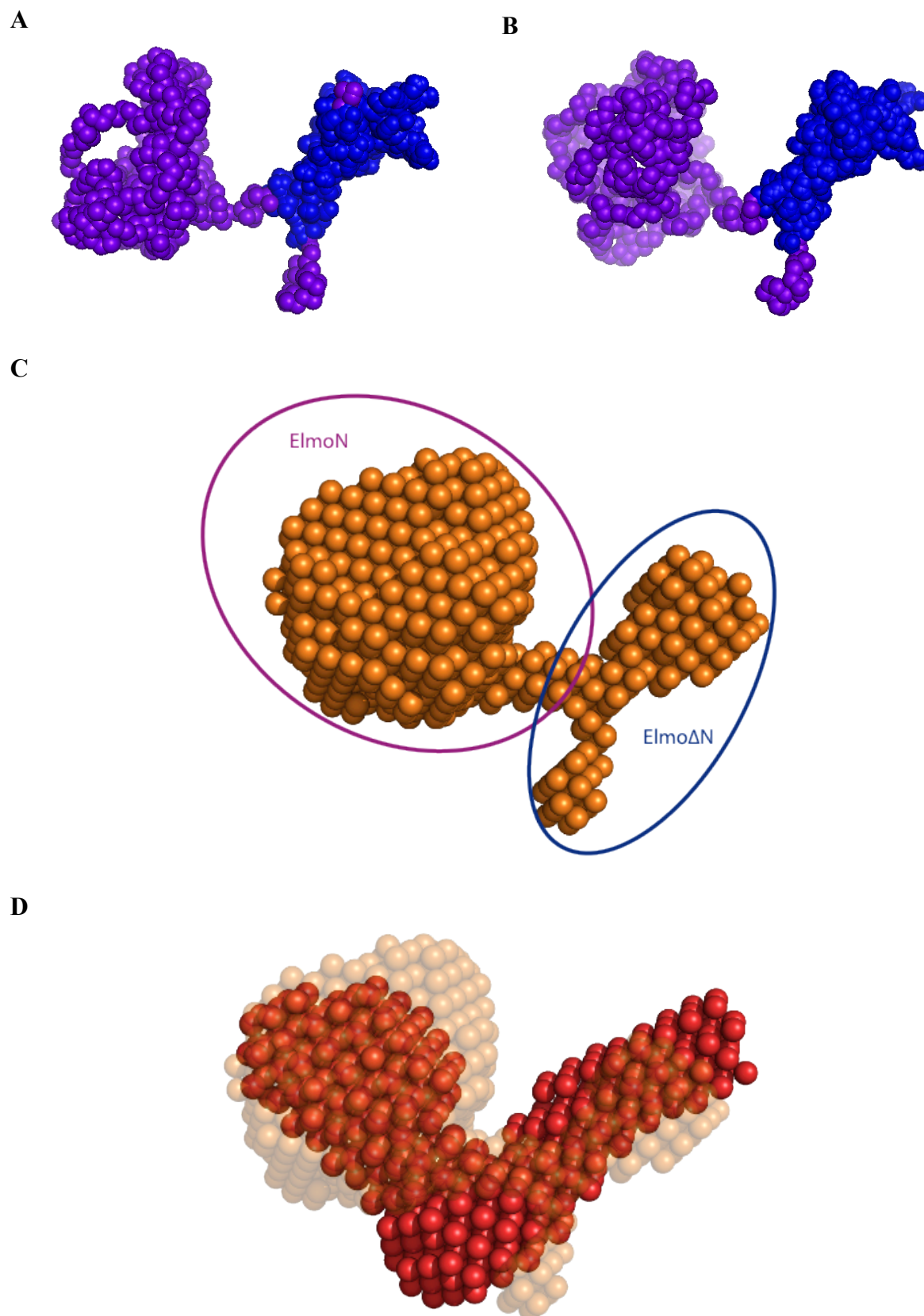
Cependant, le programme n'a pas réussi à converger vers une solution correcte. Les valeurs de Chi montrant la concordance entre chaque courbe expérimentale et le modèle sont trop élevées, supérieures à 8 (Figure 100). Nous pouvons observer notamment que les données aux plus petits angles décrivant la taille de la molécule ne coïncident pas.



**Figure 100 : Courbes obtenues par le programme BUNCH.**

**A : Superposition de la courbe expérimentale de ElmoN avec la courbe du modèle de ce même fragment en sortie de BUNCH. B : Superposition de la courbe expérimentale de ElmoWT avec la courbe du modèle de ElmoWT obtenus par le programme BUNCH.**

Une nouvelle reconstruction a alors été réalisée à partir de la structure atomique du fragment Elmo $\Delta$ N en ne prenant en compte cette fois que la courbe de diffusion de la protéine entière ElmoWT. Dix modèles ont été calculés ; avec des valeurs de Chi d'environ 2,1 ils apparaissent cohérents. Ces différents modèles sont comparés et un modèle moyen est généré par le programme DAMAVER (Figure 101). La valeur moyenne du NSD est de 1,46, la variation entre les dix modèles est inférieure à 0,04, ils ont donc tous été utilisés pour calculer le modèle moyenné.



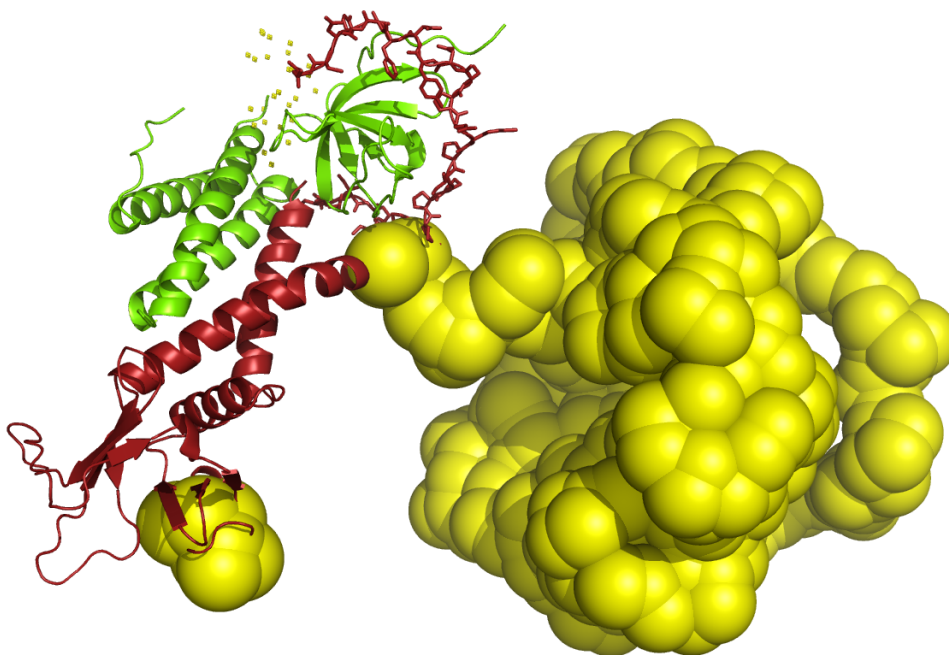
**Figure 101 : Modèles de la protéine ElmoWT par BUNCH.**

**A et B :** Deux solutions de BUNCH. En bleu la localisation de la structure atomique du domaine Elmo $\Delta$ N et en violet le modèle reconstruit du fragment ElmoN. **C :** Modèles moyen des 10 solutions de BUNCH moyenné par DAMAVER. **D :** Superposition du modèle calculé par BUNCH en orange transparent avec celui calculé par DAMMIF en rouge.

Tout d'abord, les solutions du programme BUNCH permettent de localiser le fragment Elmo $\Delta$ N dont la structure cristallographique a été utilisée (en bleu sur les figures) pour les calculs. La région N-terminale est ensuite identifiable, elle apparaît ici comme globulaire contrairement à ce que les modélisations *ab initio* des courbes de diffusion obtenues sur le domaine seul. Nous avons effectué une superposition de ce modèle moyen avec le modèle *ab initio* des protéines ElmoWT calculé par le programme DAMMIF (Figure 101). Cette superposition confirme la position des régions N et C-terminales que nous avons estimées au préalable par la superposition des modèles *ab initio* (en page 213).

Il n'a pas été possible avec le programme BUNCH de construire un modèle concordant simultanément aux données de diffusion de la protéine Elmo1 entière et à celles du fragment ElmoN. Ceci pourrait faire penser que ce fragment ElmoN n'adopte pas en solution la même conformation lorsqu'il est exprimé seul ou au sein de la protéine Elmo1 entière. En effet, nous pouvons voir que sa modélisation est différente suivant que l'on considère le modèle *ab initio* calculé par DAMMIF avec la courbe expérimentale de ce fragment ElmoN ou le modèle issu de BUNCH (Figure 101) avec uniquement les données de la protéine ElmoWT. Cependant il avait été possible de proposer une superposition de ce fragment avec le modèle de la protéine entière par la méthode de modélisation *ab initio*, bien qu'elle soit convaincante, des différences non négligeables sont observées. Par exemple, la région C-terminale manquante semble de trop faible taille par rapport à son volume réel obtenu grâce la structure cristallographie du fragment Elmo $\Delta$ N.

Enfin, la superposition de la structure du domaine SH3<sub>2</sub>-Ha en complexe avec le fragment Elmo $\Delta$ N issue du pdb id : 3A98 avec le modèle de ElmoWT de BUNCH permet de vérifier qu'avec ce modèle il n'y a pas d'encombrement stérique entre Dock2 et Elmo1 (Figure 102). Nous pouvons voir ici que l'interaction entre les deux fragments est possible : il n'y a pas de gêne stérique entre les deux molécules. Il est donc probable que la conformation de la protéine Elmo1 ne change pas lors de la complexation des deux partenaires.



**Figure 102 : Superposition de la structure pdb id 3A98 avec le modèle de BUNCH.**

La région N-terminale de Elmo1 est représentée en jaune. La structure du fragment Elmo $\Delta$ N est en rouge et la structure du fragment SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$  est en vert.

## C . Etude du complexe Elmo1/SH3<sub>1</sub> par SAXS

Afin d'étudier le complexe Elmo1/SH3<sub>1</sub>, nous avons réalisé des expériences de SAXS sur des complexes entre différents fragments de Elmo1 (ElmoWT, ElmoΔC et ElmoΔN) et le domaine SH3 de Dock1. La modélisation d'un complexe entre Elmo et le domaine SH3 de Dock1 permettrait notamment, grâce à une comparaison avec les modèles de Elmo1 déjà obtenus, de déterminer si la protéine adopte un changement de conformation lors de la formation du complexe.

### 1) *Détermination des paramètres structuraux*

Les fragments sont produits comme décrit précédemment (en page 101). Les fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille correspondant à chaque fragment sous forme monomérique sont regroupées et concentrées par centrifugation sur une membrane. Les complexes sont préparés avec un ratio équimolaire des deux partenaires à trois concentrations de complexe différentes (Tableau XLI). Chaque complexe a été incubé plus ou moins longtemps avant d'être analysé par SAXS : sans incubation préalable, avec 2 heures d'incubation à 4°C, et à température ambiante pendant 5 heures.

	ElmoWT/SH3 <sub>1</sub>	ElmoΔC/SH3 <sub>1</sub>	ElmoΔN/SH3 <sub>1</sub>
<b>Conc 1 (μM)</b>	31,6	19,2	123,5
<b>Conc 2 (μM)</b>	50,9	31,7	180,7
<b>Conc 3 (μM)</b>	61,9	57,8	364

**Tableau XLI : Concentration des complexes de protéine utilisés pour l'analyse SAXS.**  
Pour chaque complexe, trois concentrations sont réalisées.

En parallèle des enregistrements de SAXS de ces complexes, Jean-Baptiste Reiser a réalisé une chromatographie d'exclusion de taille pour chaque échantillon sans temps d'incubation afin de vérifier leur état oligomérique et la formation du complexe au moment même de leur analyse par SAXS. Ces expériences ont montré que chacune des protéines était bien sous forme monomérique mais n'a pas permis d'observer la présence de complexe stable entre les fragments de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1.

Les courbes de diffusion des échantillons sont enregistrées puis traitées et analysées de la même manière que pour les fragments de Elmo1 seuls. Les valeurs des différents paramètres structuraux sont détaillées dans le Tableau XLII.

Contrairement à ce qu'il était attendu avec la formation d'un complexe, les valeurs du  $R_g$ , de la masse moléculaire et du  $D_{max}$  sont, ici, inférieures aux valeurs pour la protéine

ElmoWT seule mesurée au préalable. Les courbes de diffusion ne montrent pas non plus de différence significative en faveur de la formation d'un complexe (Figure 103). Les mesures de SAXS reflètent certainement la moyenne de toutes les macromolécules en solution, qui sont le fragment SH3<sub>1</sub> de 7,6 kDa et un des fragments de Elmo1 de 26,2 à 87,4 kDa qui n'ont pas formé de complexe à ces concentrations.

	Masse théorique (kDa)	Masse calculée (kDa)	Rg (nm)	Dmax (nm)
<b>ElmoWT/SH3<sub>1</sub> sans incubation</b>	95	73	4,3	14
<b>ElmoWT/SH3<sub>1</sub> 25°C 5 heures</b>	95	78	4,3	16
<b>ElmoWT/SH3<sub>1</sub> 4°C 2 heures</b>	95	72	4,2	15
<b>ElmoWT</b>	87,4	90	4,4	14,1
<b>ElmoΔC/SH3<sub>1</sub> sans incubation</b>	89	71	4,1	17
<b>ElmoΔC/SH3<sub>1</sub> 25°C 5 heures</b>	89	67	4	14
<b>ElmoΔC/SH3<sub>1</sub> 4°C 2 heures</b>	89	82	4,2	13,5
<b>ElmoΔC</b>	81,4	82	4,3	16
<b>ElmoΔN/SH3<sub>1</sub> sans incubation</b>	33,8	35	3,2	12
<b>ElmoΔN/SH3<sub>1</sub> 25°C 5 heures</b>	33,8	31	3	11
<b>ElmoΔN/SH3<sub>1</sub> 4°C 2 heures</b>	33,8	25	2,8	9,5
<b>ElmoΔN</b>	26,2	33	3,1	11,5

Tableau XLII : Paramètres structuraux des complexes Elmo1/SH3<sub>1</sub> par SAXS.

Les valeurs en couleur représentent les paramètres structuraux des protéines Elmo1 seules calculés plus tôt.

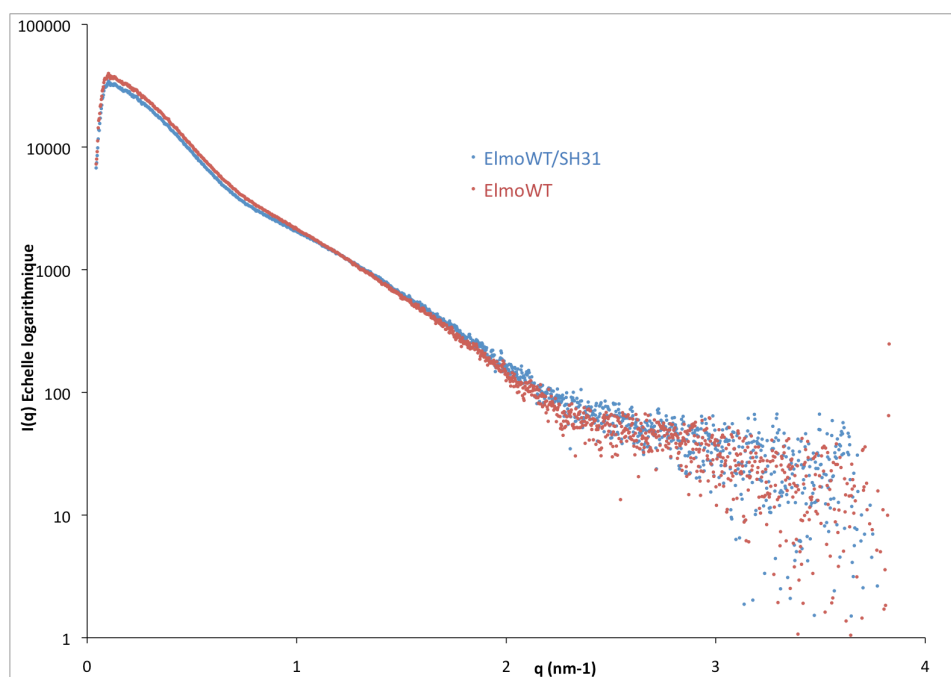


Figure 103 : Superposition des courbes de diffusion de la protéine ElmoWT en rouge et du complexe ElmoWT/SH3<sub>1</sub> en bleu. La courbe du mélange ElmoWT/SH3<sub>1</sub> en bleu est plus basse dans la région des plus petits angles, montrant ainsi que la taille moyenne des molécules en solution est plus petite que celle de l'échantillon de ElmoWT.

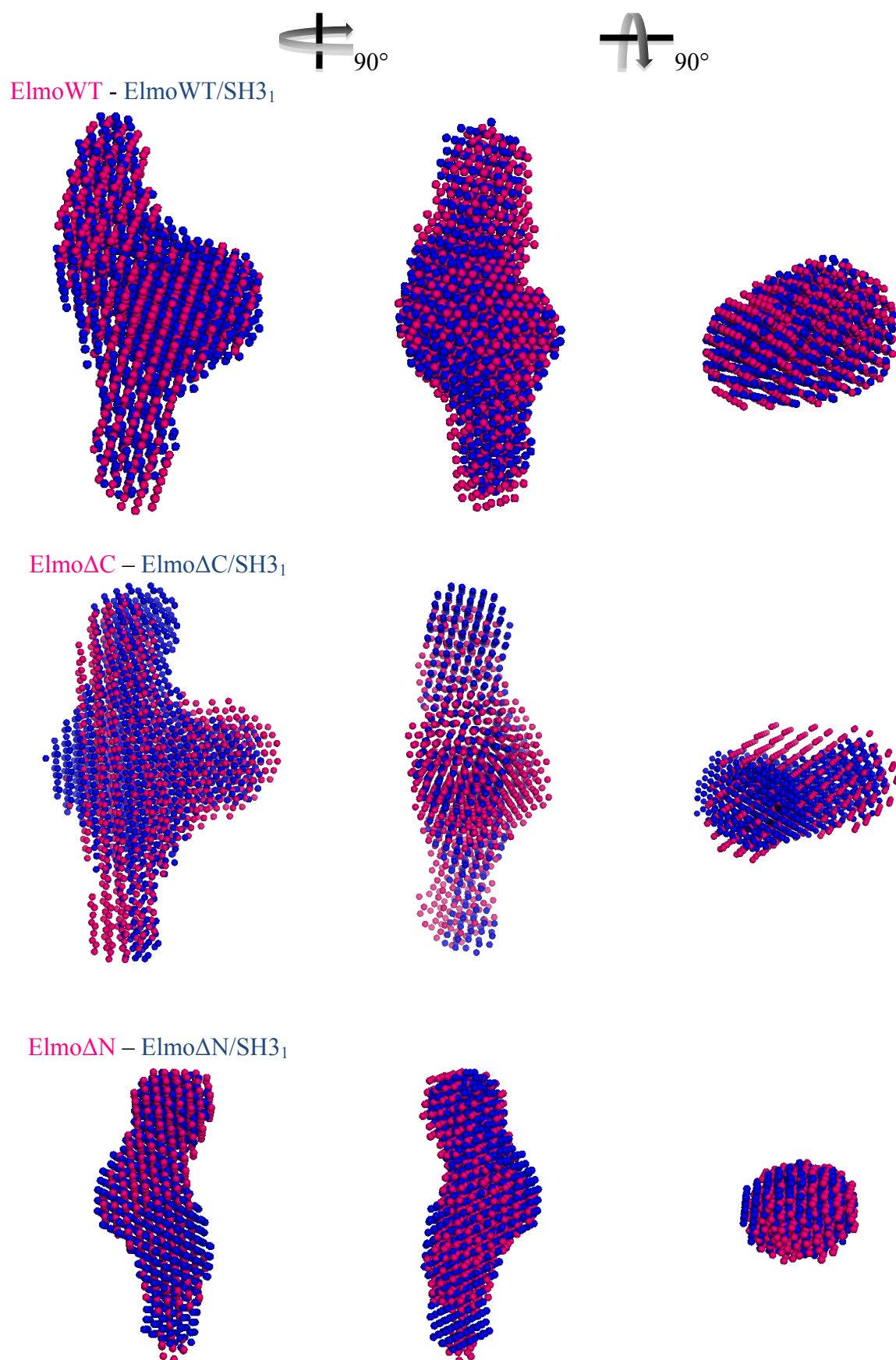
## 2) *Modélisation ab initio*

Malgré des paramètres structuraux qui ne semblent pas en accord avec la formation d'un complexe, nous avons calculé des modèles *ab initio* de ces échantillons avec l'espoir d'observer une différence avec les modèles *ab initio* obtenus pour les fragments seuls et qui reflèterait un changement structural dû à la formation du complexe.

Les enveloppes à basse résolution pour chaque échantillon, ont été déterminées de la même manière que pour les fragments de Elmo1 seuls. La superposition des différents modèles issus des données SAXS obtenues avec les échantillons de complexes Elmo1/SH3<sub>1</sub> avec ceux des échantillons de Elmo1 seuls et réalisés le même jour, ne montrent pas de différences significatives qui pourraient être le résultat de la formation d'un complexe (Figure 104).

Il n'a donc pas été possible d'observer des complexes entre les différents fragments de Elmo1 (ElmoWT, ElmoΔC et ElmoΔN) et la protéine SH3<sub>1</sub>. Les conditions expérimentales n'étaient certainement pas favorables à la formation de complexes. L'interaction entre Elmo1 et SH3<sub>1</sub> étant faible, une des solutions pour observer ce complexe serait d'augmenter la concentration des protéines. Cependant nous étions déjà ici à une concentration proche de la limite de solubilité pour la protéine SH3<sub>1</sub>.





**Figure 104 : Superposition des modèles de Elmo1 seul et en complexe avec SH3<sub>1</sub>.  
Modèles calculés par DAMMIF, en rose la protéine Elmo1 seule, en bleu le complexe Elmo1/SH3<sub>1</sub>.**



## D . Etude du complexe Elmo1/ SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ par SAXS

La production, dans les derniers mois de ma thèse, de complexes entre certains fragments de Elmo1 (ElmoWT, Elmo $\Delta$ N et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP) et la protéine SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  ont permis très récemment de réaliser des expériences de SAXS sur ces complexes.

A l'heure actuelle, les données n'ont pas encore pu être traitées. Cependant, grâce au programme automatisé d'analyse des données SAXS en ligne (Figure 105) développé par le groupe de Svergun à Hamburg (Petoukhov, Konarev et al. 2007), des premières informations ont pu être obtenues. Les paramètres structuraux (Masse moléculaire,  $R_g$  et  $D_{max}$ ) sont plus élevés qu'avec la protéine Elmo1 seule, traduisant bien la formation des complexes. Une analyse complète de ces complexes sera réalisée prochainement. Le but étant de mettre en évidence la localisation de l'interaction, mais surtout de savoir si cette interaction induit un changement de conformation de la protéine Elmo1.

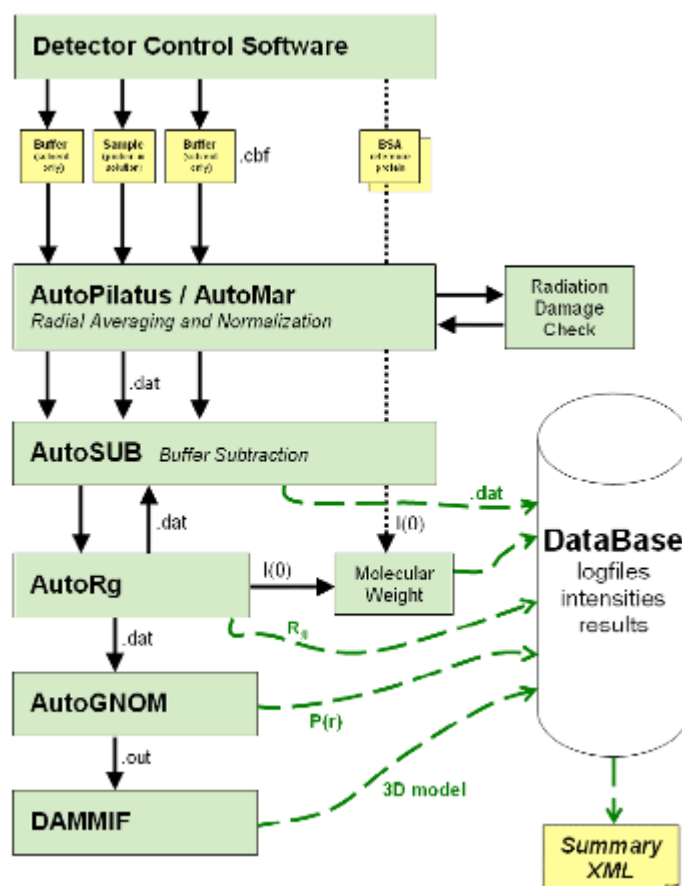


Figure 105 : Schéma général du programme automatisé d'analyse des données SAXS d'après (Petoukhov, Konarev et al. 2007).

## E . Conclusion des données de SAXS

Les expériences de SAXS menées sur différents fragments de Elmo1 ont permis d'obtenir un modèle d'enveloppe *ab initio* de la protéine entière et de la région N-terminale, nous permettant ainsi de localiser les régions N et C-terminales de Elmo1 dans le contexte de la protéine entière.

Curieusement et contrairement aux données de chromatographie d'exclusion de taille effectuées en parallèle de l'expérience SAXS, les données de diffusion du fragment Elmo $\Delta$ N suggèrent la présence d'un dimère dans l'échantillon. Une des explications plausible est que l'interaction des deux molécules est rompue lors de leur passage sur la résine de la chromatographie d'exclusion de taille pour être reformée par la suite en solution. Des mesures de DLS sur les échantillons avant les expériences de SAXS pourraient permettre de vérifier cette oligomérisation. Il semblerait que ce dimère pourrait adopter une symétrie d'ordre deux, mais le mode dimérisation exact de ce fragment n'a pas pu être déterminé avec précision. Le programme SASREF prédit en effet deux types de dimérisation possibles, la première par l'intermédiaire des hélices  $\alpha$  adjacentes au domaine PH (Cah et Nah) et la seconde via une interaction directe entre ces domaines PH.

Les essais de reconstruction de modèles à partir la structure du fragment Elmo $\Delta$ N avec le logiciel BUNCH ont permis d'obtenir de nouveaux modèles de ElmoWT et ElmoN par une méthode différente. Autant ce modèle de Elmo entier est cohérent avec le modèle *ab initio*, autant les modèles de ElmoN obtenus par les deux méthodes ne sont pas superposables. Une de nos hypothèses serait que cette région N terminale de Elmo n'adopte pas la même conformation dans le contexte de la protéine entière et lorsqu'elle est isolée. Toutefois nous ne pouvons pas savoir à l'heure actuelle si ce changement de conformation n'est qu'un artefact de production du fait que cette région soit purifiée seule ou s'il a un rôle au sein de la protéine entière.

Cependant, des études suggèrent un mécanisme d'auto-inhibition de la protéine Elmo1 par l'interaction de ses domaines EID et EAD (Patel, Margaron et al. 2010). Le domaine EID se localise dans la région N-terminale de Elmo1, tandis que le domaine EAD correspond à l'hélice  $\alpha$  Cah adjacente au domaine PH dans la région C-terminale. L'existence de cette auto-inhibition laisse ainsi supposer que Elmo1 pourrait se trouver sous deux conformations différentes selon que la protéine est inhibée ou non. Selon cette étude, la protéine seule en solution adopte la conformation auto-inhibée avec l'interaction des deux domaines EID et EAD. Ainsi, dans ce cas, les données de SAXS enregistrées sur ElmoWT représenteraient un

modèle de Elmo1 sous sa forme auto-inhibée. Ceci pourrait aisément expliquer la différence de conformation observée de la région N-terminale exprimée seule ou au sein de la protéine entière : le fragment ElmoN ne subirait pas les mêmes contraintes d'interaction qu'il soit seul ou dans le contexte de la protéine entière.

Le fragment Elmo $\Delta$ C ne contient pas le domaine EAD il ne devrait ainsi pas se trouver dans une conformation inhibée. La conformation de la région N-terminale au sein de ce fragment Elmo $\Delta$ C ne devrait donc pas être la même que pour la protéine entière ElmoWT, mais pourrait se rapprocher de celle du fragment ElmoN exprimé seul. La vérification de ces hypothèses pourrait se faire grâce à un modèle d'enveloppe du fragment Elmo $\Delta$ C. Si les différences conformationnelles de la région N-terminale entre la forme inhibée et la forme active sont assez importantes elles pourraient ainsi être visualisées par SAXS. Bien que nous ayons enregistré des données sur le fragment Elmo $\Delta$ C, la faible qualité de ces enregistrements ne nous permet pas de comparer le modèle ainsi calculé avec celui du modèle de ElmoWT. De nouvelles expériences sur ce fragment pourraient être ainsi très profitables.

Il n'a pas été possible d'analyser un modèle d'enveloppe pour la protéine Elmo1 en complexe avec le domaine SH3 de Dock1 car ce complexe ne semble pas être formé en solution lors de nos expériences. Les données de SPR montrent une affinité faible de l'ordre du micromolaire, une concentration de complexe plus importante dans les échantillons analysés serait sûrement plus favorable à la formation du complexe. Cependant, nous étions déjà ici proches de la limite de solubilité de la protéine SH3<sub>1</sub>, son augmentation pourrait entraîner un phénomène d'agrégation non compatible avec des expériences de SAXS.

Très récemment, grâce à la production de complexes entre différents fragments de Elmo1 et la protéine SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  contenant le domaine SH3 et les hélices  $\alpha$  avoisinantes de Dock1, nous avons pu réaliser de nouvelles expériences de SAXS. Nous avons enregistré des courbes de diffusions pour les complexes ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ . Nous n'avons pas encore pu analyser ces nouvelles données qui devraient apporter de nombreuses réponses à nos questions.



# Conclusions et Perspectives

---



Au cours de ce travail de thèse je me suis intéressée à Elmo et Dock, deux protéines impliquées dans une voie de signalisation du remodelage du cytosquelette d'actine lors des processus de phagocytose des corps apoptotiques et de migration. La formation du complexe Elmo/Dock semble au cœur de la régulation de l'activité GEF de Dock envers la GTPase Rac1. Le but de ma thèse était de caractériser biochimiquement et structuralement ces deux protéines et leur interaction.

Une grande partie de ma thèse a été consacrée à la préparation des protéines d'intérêt. De nombreuses étapes de clonage et de mutagenèse dirigée ont été réalisées pour permettre de produire toutes les constructions nécessaires à l'étude du complexe Elmo1/Dock. La recherche des conditions d'expression et de solubilité de ces différentes constructions a permis d'obtenir 6 fragments de Elmo1 solubles en plus de la protéine entière. La protéine Dock étant de très grande taille, nous ne nous sommes intéressés dans cette étude qu'à sa région

N-terminale impliquée dans l'interaction avec Elmo. Le domaine SH3 a ainsi été produit, cependant nous n'avons pas réussi à produire de façon soluble les fragments SH3-H $\alpha$  contenant le domaine SH3 et les hélices  $\alpha$  avoisinantes.

La purification des fragments de Elmo1 a révélé que la protéine avait tendance à former des dimères. Aucune donnée bibliographique ne mentionne cette oligomérisation. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si elle joue un rôle physiologique au sein de la cellule ou si ce n'est qu'un artefact de purification *in vitro*. La production des différents fragments de Elmo1 et du domaine SH3 de Dock1 nous a permis de mener des expériences de SPR pour analyser et quantifier l'interaction mise en jeu par chaque région de la protéine Elmo1 et des expériences de SAXS pour obtenir une première caractérisation à basse résolution de la protéine entière.

La mise en place d'un protocole expérimental de SPR permettant d'obtenir des données de qualité a été difficile. De nombreuses techniques d'immobilisation de ligand sur la puce ont dû être testées, une nouvelle méthode de cinétique (la cinétique de titration en un seul cycle) a dû être appliquée et un autre logiciel que celui du constructeur a dû être utilisé pour calculer des modèles d'ajustement des courbes expérimentales. Nous avons enregistré un très grand nombre de données au cours de ces 4 ans mais compte tenu de la grande difficulté à obtenir des sensorgrammes stables et de bonne qualité nous n'avons pu utiliser et analyser

qu'environ  $1/10^{\text{ème}}$  des données enregistrées. Nous n'avons ici obtenu que des données en utilisant le domaine SH3 comme ligand. L'enregistrement de données correctes avec l'utilisation des fragments de Elmo1 comme ligand pourrait compléter et valider les données déjà obtenues. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas encore parvenus à mettre en place des expériences acceptables avec ce mode d'immobilisation.

Nos données révèlent que l'interaction entre Elmo1 et le domaine SH3 est faible, de l'ordre du micromolaire avec un  $K_D$  de  $1,32 \cdot 10^{-6}$  M. Elles nous permettent notamment de mettre en évidence l'importance du motif PxxP de Elmo1 dans cette interaction. Toutefois, ce motif n'est pas nécessaire à l'interaction, des formes tronquées de la région C-terminale de Elmo1 possèdent toujours la capacité d'interagir avec le domaine SH3 de Dock1, avec par exemple un  $K_D$  de  $1,12 \cdot 10^{-6}$  M pour le fragment Elmo $\Delta$ PxxP. La structure du complexe Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>2</sub>-H $\alpha$  révèle en effet une interface de contact entre le domaine SH3 et les hélices  $\alpha$  encadrant le domaine PH qui pourrait représenter l'interface minimale d'interaction. Toutefois, bien que la présence du motif PxxP de Elmo1 n'augmente pas significativement l'affinité des différents complexes testés, il permet d'en augmenter leur stabilité ( $k_{\text{off}}$  passant de  $0,82 \cdot 10^{-4}$  M pour Elmo $\Delta$ PxxP à  $0,47 \cdot 10^{-4}$  M pour ElmoWT) et leur durée de demi-vie (14 minutes pour Elmo $\Delta$ PxxP et 25 minutes pour ElmoWT). Cela laisse supposer un mécanisme d'interaction en deux temps avec tout d'abord une fixation rapide mettant en jeu l'interaction des hélices  $\alpha$  encadrant le domaine PH de Elmo1. Puis dans un second temps la stabilisation de ce complexe par l'interaction du motif PxxP qui vient entourer le domaine SH3 de Dock1. Cette stabilisation viendrait renforcer le complexe pour probablement permettre l'activation de la protéine Dock et ainsi faciliter le recrutement à la membrane.

Comme nous l'avons vu plus tôt, l'interaction entre Elmo1 et Dock1 ne met pas seulement à contribution le domaine SH3 de Dock, mais aussi la région hélicale avoisinante. Nous aurions aimé pouvoir analyser l'interaction de Elmo1 avec les fragments SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  pour compléter nos données précédentes. Malheureusement nous n'avons pas réussi à produire ces fragments seuls de manière soluble et en grande quantité. Une étude plus approfondie de la recherche de conditions d'expression de façon soluble ou de renaturation après une expression en corps d'inclusion permettrait peut-être de pouvoir produire ces fragments en vue d'étudier leur interaction avec Elmo1.

De façon surprenante, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre la région N-terminale de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1 par SPR. Dans la bibliographie, les études



réalisées jusqu'à présent ne décrivent pas cette interaction. Cependant, les techniques qui ont été utilisées jusqu'à présent pour étudier l'interaction Elmo/Dock ne sont pas aussi sensibles que la SPR et une interaction faible pourrait ne pas avoir été détectée. La mise en évidence de cette interaction est issue de résultats préliminaires, il sera important d'approfondir par la suite l'étude de cette interaction en obtenant de nouvelles données.

En parallèle des expériences d'interaction, nous avons mené une recherche de détermination des conditions de cristallisation dans le but d'obtenir la structure tridimensionnelle de Elmo1, de ses domaines ou du complexe formé avec la région N-terminale de Dock1. Malgré plus de 15000 conditions de cristallisation testées nous n'avons pas obtenu à ce jour de cristal protéique rendant ainsi la détermination de structure impossible.

Pour augmenter la chance de former des cristaux de la protéine Elmo1, nous avons utilisé d'autres méthodes peu usuelles et notamment la méthode de protéolyse *in situ* avec la protéine ElmoWT. Bien qu'elle n'a pas permis d'obtenir de cristal, nous avons pu voir que cette protéolyse révélait deux fragments stables d'environ 45 et 60 kDa. Parmi les fragments déjà identifiés lors de la protéolyse ménagée avant mon arrivée au laboratoire plusieurs pourraient correspondre de par leur taille à ces deux fragments. Nous pouvons donc nous demander s'il s'agit d'un de ceux là ou si ce sont de nouveaux fragments. Il serait intéressant de les identifier pour ensuite essayer de les purifier afin de tenter de nouveaux essais de cristallisation ou mener des études d'interaction avec Dock1.

Les expériences de SAXS réalisées nous ont permis d'obtenir une première caractérisation structurale à faible résolution de la protéine Elmo1. Les données sur les différents fragments de Elmo1 permettent notamment d'obtenir un modèle d'enveloppe de la protéine entière et de la région N-terminale, les régions N et C-terminales de Elmo1 ont ainsi été localisées au sein de la protéine entière.

Les modèles obtenus par deux méthodes différentes semblent montrer que le fragment ElmoN isolé et purifié n'adopte pas la même conformation qu'au sein de la protéine Elmo1 entière. Nous ne pouvons pas savoir si ce changement de conformation n'est qu'un artefact de production du fait qu'il soit purifié seul ou s'il a un rôle au sein de la protéine entière. Le modèle d'auto-inhibition décrit par l'équipe de Patel (Patel, Margaron et al. 2010) pourrait

expliquer ce phénomène. Des données supplémentaires notamment sur le fragment Elmo $\Delta$ C qui ne contient pas le domaine EAD impliqué dans cette auto-inhibition permettront peut-être de vérifier cette hypothèse.

Bien qu'il aurait été intéressant d'obtenir des données structurales sur les complexes entre les différents fragments de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1 nous n'avons pas réussi à les former en solution pour les étudier par SAXS. Cependant, très récemment, grâce à la production de complexes entre différents fragments de Elmo1 et la protéine SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  contenant le domaine SH3 et les hélices  $\alpha$  avoisinantes de Dock1, nous avons pu réaliser de nouvelles expériences de SAXS. Des courbes de diffusions pour les complexes ElmoWT/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$ , Elmo $\Delta$ N/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  et Elmo $\Delta$ N $\Delta$ PxxP/SH3<sub>1</sub>-H $\alpha$  ont été enregistrées, les données seront analysées très prochainement et devraient, apporter des réponses à nos nombreuses questions. Notamment, les informations structurales connues à ce jour sur l'interaction de Elmo et Dock se limitent à la région C-terminale de Elmo1. L'obtention d'un modèle de complexe de la protéine Elmo entière en complexe avec le fragment SH3-H $\alpha$  de Dock1 permettrait d'avoir enfin une vue globale de l'interaction. Ces données permettront peut-être de visualiser un changement dans la conformation de Elmo1 lorsqu'il est libre ou en complexe.

Au cours de cette thèse, plusieurs informations obtenues par SPR suggèrent une interaction inattendue entre le domaine N-terminal de Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1. La localisation de cette région N-terminale par rapport au domaine SH3 de Dock1 au sein du complexe pourrait donner des informations complémentaires quant à la possibilité qu'il y ait une interaction entre ces deux régions. Il ne faut pas non plus écarter le fait que cette interaction visible par SPR pourrait être uniquement le fait d'un artefact dû à la production du domaine N-terminal seul et ne pas exister au sein de la protéine Elmo1 entière.

La régulation de Dock par Elmo semble complexe. Ces années de travail ont permis de lever le voile sur une fraction des mécanismes mis en jeu dans l'interaction Dock/Elmo pour activer la fonction GEF envers Rac1 et le remodelage du cytosquelette d'actine. En effet, l'interaction du motif PxxP avec le domaine SH3 de Dock1 permet de stabiliser le complexe. Cette stabilisation dans le temps pourrai jouer un rôle important pour le recrutement du complexe Elmo/Dock à la membrane et promouvoir le remodelage du cytosquelette d'actine durant toute l'étape de la phagocytose. Une des prochaines étapes avec les collaborateurs de notre équipe sera d'évaluer finement le rôle de chaque domaine dans un modèle cellulaire.

# Références

---



- Aderem, A. (2003). "Phagocytosis and the inflammatory response." J Infect Dis **187 Suppl 2**: S340-345.
- Adra, C. N., D. Manor, et al. (1997). "RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4279-4284.
- Aghazadeh, B., K. Zhu, et al. (1998). "Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain." Nat Struct Biol **5**(12): 1098-1107.
- Ahuja, R., R. Pinyol, et al. (2007). "Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology." Cell **131**(2): 337-350.
- Albert, M. L., J. I. Kim, et al. (2000). "alpha5 beta1 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells." Nat Cell Biol **2**(12): 899-905.
- Allen, W. E., D. Zicha, et al. (1998). "A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis." J Cell Biol **141**(5): 1147-1157.
- Aslanidis, C. and P. J. de Jong (1990). "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)." Nucleic Acids Res **18**(20): 6069-6074.
- Bamburg, J. R., A. McGough, et al. (1999). "Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics." Trends Cell Biol **9**(9): 364-370.
- Bar-Sagi, D. and A. Hall (2000). "Ras and Rho GTPases: a family reunion." Cell **103**(2): 227-238.
- Beningo, K. A., M. Dembo, et al. (2001). "Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts." J Cell Biol **153**(4): 881-888.
- Benyamin, Y., M. Roger, et al. (1980). "A competitive radioimmunoassay on a magnetic phase for actin detection." FEBS Lett **110**(2): 327-329.
- Bernards, A. and J. Settleman (2004). "GAP control: regulating the regulators of small GTPases." Trends Cell Biol **14**(7): 377-385.
- Bershadsky, A. D., N. Q. Balaban, et al. (2003). "Adhesion-dependent cell mechanosensitivity." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 677-695.
- Blasius, A. L., K. Brandl, et al. (2009). "Mice with mutations of Dock7 have generalized hypopigmentation and white-spotting but show normal neurological function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2706-2711.
- Bonder, E. M., D. J. Fishkind, et al. (1983). "Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament." Cell **34**(2): 491-501.
- Borisy, G. G. and T. M. Svitkina (2000). "Actin machinery: pushing the envelope." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 104-112.

- Bos, J. L., H. Rehmann, et al. (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.
- Bourmeyster, N. and P. V. Vignais (1996). "Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the Rho A-Rho GDI complex in neutrophil cytosol." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 54-60.
- Bowzard, J. B., D. Cheng, et al. (2007). "ELMOD2 is an Arl2 GTPase-activating protein that also acts on Arfs." J Biol Chem **282**(24): 17568-17580.
- Broussard, J. A., D. J. Webb, et al. (2008). "Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 85-90.
- Brugnera, E., L. Haney, et al. (2002). "Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex." Nat Cell Biol **4**(8): 574-582.
- Burridge, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-179.
- Carlier, M. F. (1991). "Actin: protein structure and filament dynamics." J Biol Chem **266**(1): 1-4.
- Carson, M., A. Weber, et al. (1986). "An actin-nucleating activity in polymorphonuclear leukocytes is modulated by chemotactic peptides." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2707-2714.
- Cau, J. and A. Hall (2005). "Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways." J Cell Sci **118**(Pt 12): 2579-2587.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-222.
- Cherfils, J. and P. Chardin (1999). "GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **24**(8): 306-311.
- Chesarone, M. A., A. G. DuPage, et al. (2010). "Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 62-74.
- Chhabra, E. S. and H. N. Higgs (2007). "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures." Nat Cell Biol **9**(10): 1110-1121.
- Chung, S., T. L. Gumieny, et al. (2000). "A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*." Nat Cell Biol **2**(12): 931-937.
- Coates, T. D., R. G. Watts, et al. (1992). "Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils." J Cell Biol **117**(4): 765-774.
- Condeelis, J., R. H. Singer, et al. (2005). "The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 695-718.
- Cote, J. F., A. B. Motoyama, et al. (2005). "A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-binding domain is necessary for DOCK180 signalling." Nat Cell Biol

7(8): 797-807.

- Cote, J. F. and K. Vuori (2002). "Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4901-4913.
- Cote, J. F. and K. Vuori (2006). "In vitro guanine nucleotide exchange activity of DHR-2/DOCKER/CZH2 domains." Methods Enzymol **406**: 41-57.
- Cote, J. F. and K. Vuori (2007). "GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways." Trends Cell Biol **17**(8): 383-393.
- Cotteret, S. and J. Chernoff (2002). "The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac." Genome Biol **3**(2): REVIEWS0002.
- Crespo, P., K. E. Schuebel, et al. (1997). "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product." Nature **385**(6612): 169-172.
- Crowley, E. and A. F. Horwitz (1995). "Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions." J Cell Biol **131**(2): 525-537.
- Das, S., K. A. Owen, et al. (2011). "Brain angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is a pattern recognition receptor that mediates macrophage binding and engulfment of Gram-negative bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 2136-2141.
- Deacon, N. J., A. Tsykin, et al. (1995). "Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients." Science **270**(5238): 988-991.
- deBakker, C. D., L. B. Haney, et al. (2004). "Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO." Curr Biol **14**(24): 2208-2216.
- DerMardirossian, C. and G. M. Bokoch (2005). "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation." Trends Cell Biol **15**(7): 356-363.
- Devitt, A., K. G. Parker, et al. (2004). "Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14<sup>-/-</sup> mice." J Cell Biol **167**(6): 1161-1170.
- Dong, A., X. Xu, et al. (2007). "In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination." Nat Methods **4**(12): 1019-1021.
- Dransfield, I., S. C. Stocks, et al. (1995). "Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis." Blood **85**(11): 3264-3273.
- Duchek, P., K. Somogyi, et al. (2001). "Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor." Cell **107**(1): 17-26.
- Edelhoch, H. (1967). "Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins." Biochemistry **6**(7): 1948-1954.
- Edwards, D. C., L. C. Sanders, et al. (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." Nat Cell Biol **1**(5): 253-259.

- Elliott, M. R., S. Zheng, et al. (2010). "Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo." Nature **467**(7313): 333-337.
- Ellis, R. E., D. M. Jacobson, et al. (1991). "Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **129**(1): 79-94.
- Erickson, M. R., B. J. Galletta, et al. (1997). "Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization." J Cell Biol **138**(3): 589-603.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **5**(7): 551-562.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-898.
- Fadok, V. A. and G. Chimini (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." Semin Immunol **13**(6): 365-372.
- Fadok, V. A., J. S. Savill, et al. (1992). "Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells." J Immunol **149**(12): 4029-4035.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.
- Foster, J. L. and J. V. Garcia (2008). "HIV-1 Nef: at the crossroads." Retrovirology **5**: 84.
- Franc, N. C. (2002). "Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences." Front Biosci **7**: d1298-1313.
- Franke, D. and D. I. Svergun (2009). "DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering." Journal of Applied Crystallography **42**: 342-346.
- Fujii, T., A. H. Iwane, et al. (2010). "Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy." Nature **467**(7316): 724-728.
- Fukui, Y., O. Hashimoto, et al. (2001). "Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration." Nature **412**(6849): 826-831.
- Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, et al. (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins." Oncogene **5**(9): 1321-1328.
- Gadea, G., V. Sanz-Moreno, et al. (2008). "DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells." Curr Biol **18**(19): 1456-1465.
- Galbraith, C. G. and M. P. Sheetz (1997). "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9114-9118.



- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, et al. (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-334.
- Geyer, M. and A. Wittinghofer (1997). "GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins." Curr Opin Struct Biol **7**(6): 786-792.
- Gimona, M., R. Buccione, et al. (2008). "Assembly and biological role of podosomes and invadopodia." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 235-241.
- Gorvel, J. P., T. C. Chang, et al. (1998). "Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity." FEBS Lett **422**(2): 269-273.
- Gotoh, K., Y. Tanaka, et al. (2008). "Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells." Blood **111**(6): 2973-2976.
- Grimsley, C. and K. S. Ravichandran (2003). "Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals." Trends Cell Biol **13**(12): 648-656.
- Grimsley, C. M., J. M. Kinchen, et al. (2004). "Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration." J Biol Chem **279**(7): 6087-6097.
- Grimsley, C. M., M. Lu, et al. (2006). "Characterization of a novel interaction between ELMO1 and ERM proteins." J Biol Chem **281**(9): 5928-5937.
- Grizot, S., J. Fauré, et al. (2001). "Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation." Biochemistry **40**(34): 10007-10013.
- Gumienny, T. L., E. Brugnera, et al. (2001). "CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration." Cell **107**(1): 27-41.
- Hall, A. (2005). "Rho GTPases and the control of cell behaviour." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 891-895.
- Hall, B. E., D. Bar-Sagi, et al. (2002). "The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12138-12142.
- Hamon, Y., D. Trompier, et al. (2006). "Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10." PLoS One **1**: e120.
- Hanawa-Suetsugu, K., M. Kukimoto-Niino, et al. (2012). "Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3305-3310.
- Harada, Y., Y. Tanaka, et al. (2012). "DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses." Blood **119**(19): 4451-4461.
- Hasegawa, H., E. Kiyokawa, et al. (1996). "DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane." Mol Cell Biol **16**(4): 1770-1776.

- Hedgecock, E. M., J. E. Sulston, et al. (1983). "Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Science **220**(4603): 1277-1279.
- Henson, P. M., D. L. Bratton, et al. (2001). "Apoptotic cell removal." Curr Biol **11**(19): R795-805.
- Hiramoto, K., M. Negishi, et al. (2006). "Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration." Exp Cell Res **312**(20): 4205-4216.
- Hirshberg, M., R. W. Stockley, et al. (1997). "The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue." Nat Struct Biol **4**(2): 147-152.
- Ho, E., T. Irvine, et al. (2009). "Integrin-linked kinase interactions with ELMO2 modulate cell polarity." Mol Biol Cell **20**(13): 3033-3043.
- Ho, H. Y., R. Rohatgi, et al. (2004). "Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex." Cell **118**(2): 203-216.
- Hoffman, G. R., N. Nassar, et al. (2000). "Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI." Cell **100**(3): 345-356.
- Huynh, H. (2002). "Induction of apoptosis in rat ventral prostate by finasteride is associated with alteration in MAP kinase pathways and Bcl-2 related family of proteins." Int J Oncol **20**(6): 1297-1303.
- Ishimaru, S., R. Ueda, et al. (2004). "PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis." EMBO J **23**(20): 3984-3994.
- Itoh, R. E., K. Kurokawa, et al. (2002). "Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells." Mol Cell Biol **22**(18): 6582-6591.
- Jabara, H. H., D. R. McDonald, et al. (2012). "DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation." Nat Immunol **13**(6): 612-620.
- Janardhan, A., T. Swigut, et al. (2004). "HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis." PLoS Biol **2**(1): E6.
- Janeway, C. A. (2001). "How the immune system protects the host from infection." Microbes Infect **3**(13): 1167-1171.
- Jay, P. Y., P. A. Pham, et al. (1995). "A mechanical function of myosin II in cell motility." J Cell Sci **108** ( Pt 1): 387-393.
- Jehle, A. W., S. J. Gardai, et al. (2006). "ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages." J Cell Biol **174**(4): 547-556.
- Johnson, K. R., C. M. Longo-Guess, et al. (2012). "Mutations of the mouse ELMO domain containing 1 gene (*Elmod1*) link small GTPase signaling to actin cytoskeleton dynamics in hair cell stereocilia." PLoS One **7**(4): e36074.
- Karlsson, R., P. S. Katsamba, et al. (2006). "Analyzing a kinetic titration series using affinity

- biosensors." Anal Biochem **349**(1): 136-147.
- Katoh, H., K. Hiramoto, et al. (2006). "Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration." J Cell Sci **119**(Pt 1): 56-65.
- Katoh, H. and M. Negishi (2003). "RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo." Nature **424**(6947): 461-464.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, Y., P. Quartey, et al. (2008). "Large-scale evaluation of protein reductive methylation for improving protein crystallization." Nat Methods **5**(10): 853-854.
- Kinchen, J. M., J. Cabello, et al. (2005). "Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*." Nature **434**(7029): 93-99.
- Kirchhoff, F., T. C. Greenough, et al. (1995). "Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection." N Engl J Med **332**(4): 228-232.
- Kiss, R. S., Z. Ma, et al. (2006). "The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux." J Biol Chem **281**(17): 12081-12092.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, et al. (1998). "Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex." J Biol Chem **273**(38): 24479-24484.
- Koch, M. H., P. Vachette, et al. (2003). "Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution." Q Rev Biophys **36**(2): 147-227.
- Komander, D., M. Patel, et al. (2008). "An Alpha-Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling." Mol Biol Cell.
- Konarev (2003). "PRIMUS: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis." journal of applied crystallography **36**: 1277-1282.
- Kono, H. and K. L. Rock (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-289.
- Kozin, M. B. and D. I. Svergun (2001). "Automated matching of high- and low-resolution structural models." journal of applied crystallography **34**(1): 33-41.
- Kraynov, V. S., C. Chamberlain, et al. (2000). "Localized Rac activation dynamics visualized in living cells." Science **290**(5490): 333-337.
- Kristelly, R., G. Gao, et al. (2004). "Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor." J Biol Chem **279**(45): 47352-47362.

- Kulkarni, K., J. Yang, et al. (2011). "Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors." J Biol Chem **286**(28): 25341-25351.
- Kunisaki, Y., A. Nishikimi, et al. (2006). "DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis." J Cell Biol **174**(5): 647-652.
- Kuramoto, K., M. Negishi, et al. (2009). "Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons." J Neurosci Res **87**(8): 1794-1805.
- Laggner, P., O. Glatter, et al. (1977). "The lipid bilayer structure of the abnormal human plasma lipoprotein X. An X-ray small-angle-scattering study." Eur J Biochem **77**(1): 165-171.
- Landry, Y. D., M. Denis, et al. (2006). "ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions." J Biol Chem **281**(47): 36091-36101.
- Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." Mol Cell **14**(3): 277-287.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.
- Laurin, M., N. Fradet, et al. (2008). "The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15446-15451.
- Lawson, M. A. and F. R. Maxfield (1995). "Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils." Nature **377**(6544): 75-79.
- Lee, J., M. Leonard, et al. (1994). "Traction forces generated by locomoting keratocytes." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1957-1964.
- Lemmon, M. A. (2008). "Membrane recognition by phospholipid-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 99-111.
- Lin, Q., W. Yang, et al. (2006). "Identification of a DOCK180-related guanine nucleotide exchange factor that is capable of mediating a positive feedback activation of Cdc42." J Biol Chem **281**(46): 35253-35262.
- Liu, X., F. Li, et al. (2012). "Solution structure of the SH3 domain of DOCK180." Proteins.
- Lu, M., J. M. Kinchen, et al. (2004). "PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180." Nat Struct Mol Biol **11**(8): 756-762.
- Lu, M., J. M. Kinchen, et al. (2005). "A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs." Curr Biol **15**(4): 371-377.
- Lu, M. and K. S. Ravichandran (2006). "Dock180-ELMO cooperation in Rac activation." Methods Enzymol **406**: 388-402.
- Luciani, M. F. and G. Chimini (1996). "The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death." EMBO J

**15(2): 226-235.**

- Makino, Y., M. Tsuda, et al. (2006). "Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180." J Cell Sci **119**(Pt 5): 923-932.
- Manaka, J., T. Kuraishi, et al. (2004). "Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages." J Biol Chem **279**(46): 48466-48476.
- Matozaki, T., H. Nakanishi, et al. (2000). "Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades." Cell Signal **12**(8): 515-524.
- Matsuda, M., S. Ota, et al. (1996). "Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins." J Biol Chem **271**(24): 14468-14472.
- Meller, N., M. Irani-Tehrani, et al. (2002). "Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins." Nat Cell Biol **4**(9): 639-647.
- Meller, N., M. Irani-Tehrani, et al. (2004). "The novel Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, zizimin1, dimerizes via the Cdc42-binding CZH2 domain." J Biol Chem **279**(36): 37470-37476.
- Meller, N., M. J. Westbrook, et al. (2008). "Function of the N-terminus of zizimin1: autoinhibition and membrane targeting." Biochem J **409**(2): 525-533.
- Merlot, S. and R. A. Firtel (2003). "Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways." J Cell Sci **116**(Pt 17): 3471-3478.
- Millard, T. H., S. J. Sharp, et al. (2004). "Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex." Biochem J **380**(Pt 1): 1-17.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, et al. (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell **4**(4): 549-560.
- Miyamoto, S., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." Science **267**(5199): 883-885.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, et al. (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." J Cell Biol **131**(3): 791-805.
- Miyamoto, Y., J. Yamauchi, et al. (2007). "Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth." Exp Cell Res **313**(4): 791-804.
- Moskwa, P., M. H. Paclet, et al. (2005). "Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases." J Biol Chem **280**(8): 6716-6720.
- Mullins, R. D. and T. D. Pollard (1999). "Structure and function of the Arp2/3 complex." Curr Opin Struct Biol **9**(2): 244-249.

- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Namekata, K., Y. Enokido, et al. (2004). "MOCA induces membrane spreading by activating Rac1." J Biol Chem **279**(14): 14331-14337.
- Namekata, K., N. Nishimura, et al. (2002). "Presenilin-binding protein forms aggresomes in monkey kidney COS-7 cells." J Neurochem **82**(4): 819-827.
- Nieba, L., S. E. Nieba-Axmann, et al. (1997). "BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip." Anal Biochem **252**(2): 217-228.
- Niedergang, F. and P. Chavrier (2004). "Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 422-428.
- Nishihara, H. (1999). "Analysis of hematopoietic cell specific protein, M-DOCK." Hokkaido Igaku Zasshi **74**(2): 157-166.
- Nishikimi, A., N. Meller, et al. (2005). "Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes." FEBS Lett **579**(5): 1039-1046.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Ohashi, K., K. Nagata, et al. (2000). "Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop." J Biol Chem **275**(5): 3577-3582.
- Oliver, T., M. Dembo, et al. (1999). "Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes." J Cell Biol **145**(3): 589-604.
- Omi, N., E. Kiyokawa, et al. (2008). "Mutation of Dock5, a member of the guanine exchange factor Dock180 superfamily, in the rupture of lens cataract mouse." Exp Eye Res **86**(5): 828-834.
- Otterbein, L. R., P. Graceffa, et al. (2001). "The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state." Science **293**(5530): 708-711.
- Pace, C. N., F. Vajdos, et al. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Sci **4**(11): 2411-2423.
- Paduch, M., F. Jeleń, et al. (2001). "Structure of small G proteins and their regulators." Acta Biochim Pol **48**(4): 829-850.
- Païdassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2008). "C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition." J Immunol **180**(4): 2329-2338.
- Palecek, S. P., J. C. Loftus, et al. (1997). "Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness." Nature **385**(6616): 537-540.



- Pallari, H. M. and J. E. Eriksson (2006). "Intermediate filaments as signaling platforms." Sci STKE **2006**(366): pe53.
- Park, D., A. C. Tosello-Tramont, et al. (2007). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." Nature **450**(7168): 430-434.
- Patel, M., Y. Margaron, et al. (2010). "An Evolutionarily Conserved Autoinhibitory Molecular Switch in ELMO Proteins Regulates Rac Signaling." Curr Biol.
- Petoukhov, M. V., N. A. Eady, et al. (2002). "Addition of missing loops and domains to protein models by x-ray solution scattering." Biophys J **83**(6): 3113-3125.
- Petoukhov, M. V., P. V. Konarev, et al. (2007). "ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis." Journal of Applied Crystallography **40**: S223-S228.
- Petoukhov, M. V. and D. I. Svergun (2005). "Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data." Biophys J **89**(2): 1237-1250.
- Premkumar, L., A. A. Bobkov, et al. (2010). "Structural basis of membrane targeting by the Dock180 family of Rho family guanine exchange factors (Rho-GEFs)." J Biol Chem **285**(17): 13211-13222.
- Price, D. A., A. K. Sewell, et al. (1998). "Antigen-specific release of beta-chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes." Curr Biol **8**(6): 355-358.
- Putnam, C. D., M. Hammel, et al. (2007). "X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution." Q Rev Biophys **40**(3): 191-285.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, et al. (2005). "Drosophila Spire is an actin nucleation factor." Nature **433**(7024): 382-388.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Randall, K. L., S. S. Chan, et al. (2011). "DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice." J Exp Med **208**(11): 2305-2320.
- Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2004). "The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 193-221.
- Renault, L., B. Bugyi, et al. (2008). "Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics." Trends Cell Biol **18**(10): 494-504.
- Rid, R., N. Schiefermeier, et al. (2005). "The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells." Cell Motil Cytoskeleton **61**(3): 161-171.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends Cell Biol **11**(12): 471-477.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **57**: 661-671.

- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-399.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-410.
- Rohatgi, R., L. Ma, et al. (1999). "The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly." Cell **97**(2): 221-231.
- Rossman, K. L. and S. L. Campbell (2000). "Bacterial expressed DH and DH/PH domains." Methods Enzymol **325**: 25-38.
- Rossman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-180.
- Rossman, K. L., D. K. Worthyake, et al. (2002). "A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange." EMBO J **21**(6): 1315-1326.
- Rushton, E., R. Drysdale, et al. (1995). "Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for Drosophila muscle development." Development **121**(7): 1979-1988.
- Russo, C., Y. Gao, et al. (2001). "Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain." J Biol Chem **276**(22): 19524-19531.
- Ruusala, A. and P. Aspenström (2004). "Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology." FEBS Lett **572**(1-3): 159-166.
- Sanders, M. A., D. Ampasala, et al. (2009). "DOCK5 and DOCK1 regulate Caco-2 intestinal epithelial cell spreading and migration on collagen IV." J Biol Chem **284**(1): 27-35.
- Sanui, T., A. Inayoshi, et al. (2003). "DOCK2 is essential for antigen-induced translocation of TCR and lipid rafts, but not PKC-theta and LFA-1, in T cells." Immunity **19**(1): 119-129.
- Sanui, T., A. Inayoshi, et al. (2003). "DOCK2 regulates Rac activation and cytoskeletal reorganization through interaction with ELMO1." Blood **102**(8): 2948-2950.
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, et al. (2008). "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." Cell **135**(3): 510-523.
- Savill, J. (1997). "Apoptosis in resolution of inflammation." J Leukoc Biol **61**(4): 375-380.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-788.



- Savill, J. S., A. H. Wyllie, et al. (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-875.
- Scherle, P., T. Behrens, et al. (1993). "Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7568-7572.
- Schmidt, C. E., A. F. Horwitz, et al. (1993). "Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated." J Cell Biol **123**(4): 977-991.
- Schneider, I. C. and J. M. Haugh (2006). "Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation." Cell Cycle **5**(11): 1130-1134.
- Scott, M. P., F. Zappacosta, et al. (2002). "Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1." J Biol Chem **277**(31): 28238-28246.
- Sekimata, M., Y. Kabuyama, et al. (1999). "Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho." J Biol Chem **274**(25): 17757-17762.
- Sevajol, M., J. B. Reiser, et al. (2012). "The C-terminal polyproline-containing region of ELMO contributes to an increase in the life-time of the ELMO-DOCK complex." Biochimie **94**(3): 823-828.
- Su, H. C., H. Jing, et al. (2011). "DOCK8 deficiency." Ann N Y Acad Sci **1246**: 26-33.
- Su, H. P., K. Nakada-Tsukui, et al. (2002). "Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." J Biol Chem **277**(14): 11772-11779.
- Suetsugu, S., S. Kurisu, et al. (2006). "Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac." J Cell Biol **173**(4): 571-585.
- Sullivan, S. J., G. Daukas, et al. (1984). "Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes." J Cell Biol **99**(4 Pt 1): 1461-1467.
- Svergun, D. I. (1992). "Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria." Journal of Applied Crystallography **25**: 495-503.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1801-1809.
- Tatin, F., C. Varon, et al. (2006). "A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester." J Cell Sci **119**(Pt 4): 769-781.
- Taylor, J. M., M. M. Macklem, et al. (1999). "Cytoskeletal changes induced by GRAF, the

- GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho." J Cell Sci **112 ( Pt 2)**: 231-242.
- Ueda, S., S. Fujimoto, et al. (2008). "Dock4 regulates dendritic development in hippocampal neurons." J Neurosci Res **86**(14): 3052-3061.
- van Nieuwenhuijze, A. E., T. van Lopik, et al. (2003). "Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **62**(1): 10-14.
- Vanni, C., A. Parodi, et al. (2004). "Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl in vivo." Oncogene **23**(23): 4098-4106.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." Cell **96**(2): 245-254.
- Venier, P., A. C. Maggs, et al. (1994). "Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations." J Biol Chem **269**(18): 13353-13360.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." Science **294**(5545): 1299-1304.
- Vigorito, E., S. Bell, et al. (2004). "Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG." Mol Cell Biol **24**(2): 719-729.
- Viorritto, I. C., N. P. Nikolov, et al. (2007). "Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance?" Clin Immunol **122**(2): 125-134.
- Volkov, V. V. and D. I. Svergun (2003). "Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering." journal of applied crystallography **36**(3 Part 1): 860-864.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.
- Walter, T. S., C. Meier, et al. (2006). "Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization." Structure **14**(11): 1617-1622.
- Watabe-Uchida, M., K. A. John, et al. (2006). "The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18." Neuron **51**(6): 727-739.
- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." Nat Cell Biol **4**(4): E97-100.
- Wennerberg, K. and C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1301-1312.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). "The Ras superfamily at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 5): 843-846.
- Wernimont, A. and A. Edwards (2009). "In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update." PLoS One **4**(4): e5094.
- Wheeler, A. P. and A. J. Ridley (2004). "Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility." Exp Cell Res **301**(1): 43-49.

- Wheelerlock, M. and H. Mellor (2002). "The Rho GTPase family: a Rac to Rho story." J Cell Sci **115**(Pt 2): 239-240.
- Wojdyr, M. (2010). "Fityk: a general-purpose peak fitting program." journal of applied crystallography **43**(5 Part 1): 1126-1128.
- Worthylake, D. K., K. L. Rossman, et al. (2000). "Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1." Nature **408**(6813): 682-688.
- Wu, X., B. Gan, et al. (2005). "FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation." Dev Cell **9**(2): 185-196.
- Wu, Y. C., T. W. Cheng, et al. (2002). "Distinct rac activation pathways control *Caenorhabditis elegans* cell migration and axon outgrowth." Dev Biol **250**(1): 145-155.
- Wu, Y. C. and H. R. Horvitz (1998). "C. elegans phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180." Nature **392**(6675): 501-504.
- Wu, Y. C., M. C. Tsai, et al. (2001). "C. elegans CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment." Dev Cell **1**(4): 491-502.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Yajnik, V., C. Paulding, et al. (2003). "DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis." Cell **112**(5): 673-684.
- Yamauchi, J., Y. Miyamoto, et al. (2008). "ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration." J Cell Biol **181**(2): 351-365.
- Yan, J. and T. Jin (2012). "Signaling network from GPCR to the actin cytoskeleton during chemotaxis." Bioarchitecture **2**(1): 15-18.
- Yan, J., V. Mihaylov, et al. (2012). "A Gbetagamma effector, ElmoE, transduces GPCR signaling to the actin network during chemotaxis." Dev Cell **22**(1): 92-103.
- Yang, J., Z. Zhang, et al. (2009). "Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor." Science **325**(5946): 1398-1402.
- Yokoyama, N., C. D. deBakker, et al. (2005). "Identification of tyrosine residues on ELMO1 that are phosphorylated by the Src-family kinase Hck." Biochemistry **44**(24): 8841-8849.
- Zheng, Y., M. J. Hart, et al. (1993). "Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain." J Biol Chem **268**(33): 24629-24634.
- Zhou, Z., E. Caron, et al. (2001). "The C. elegans PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway." Dev Cell **1**(4): 477-489.

Zigmond, S. H. (2004). "Formin-induced nucleation of actin filaments." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 99-105.

# Annexe

---



## Séquence primaire des protéines Elmo1 et Dock1 utilisées :

>Elmo1 mus musculus

MPPPSDIVKVAIEWPGAYPKLMEIDQKKPLSAIIEVCDGWSLANHEYFALQHADSSN  
FYITEKNRNEIKNGTILRLTTSPAQNAQQLHERIQSSSMDAKLEALKDLASLSRDVTFA  
QEFINLDGISLLTQMVESGTERYQKLQKIMKPCFGDMLSFTLTAFVELMDHGIVSWD  
TFSVAFIKKIASFVNKSAIDISILQRSLAILESMVLNSHDLYQKVAQEITIGQLIPHLQGT  
DQEIQTYTIAVINALFLKAPDERRQEMANILAQKQLRYIILTHVIRAQRAINNEMAHQL  
YVLQVLTFNLLDRMMTKMDPQDQAQRDIIFELRRIAFDAESEPNSSSGSMEKRKSM  
YTRDYKKLGFINVNPAMDFTQTPPGMLALDNMLYFAKHHQDAYIRIVLENSRED  
KHECPFGRSSIELTKMLCEILKVGELPSETCNDFFHPMFFTHDRSFEEFFCICIQLLNKTW  
KEMRATSEDFNKVMQVVKEQVMRALTTKPSSLDQFKSKLQNLSTYTEILKIRQSERN  
QEDFQSRPILELKEKIQPEILELIKQQLNRLVEGTCFRKLNARRRQDKFWYCRLSPNH  
KVLHYGDLEESPQGEVPHDSLQDKLPVADIKAVVTGKDCPHMKEKGALKQNKVELE  
LAFSILYDSNCQLNFIAPDKHEYCIWTDGLNALLGKDMMSDLTRNDLDTLLSMEIKL  
RLLDLENIQIPDAPPPIPKEPSNYDFVYDCN

>Dock1 human

MTRWVPTKREEKYGVAFYNYDARGADELSLQIGDTVHILETYEGWYRGYTLRKKSK  
KGIFFASYIHLKEAIVEGKGQHETVIPGDLPLIQEVTTTLREWSTIWRQLYVQDNREMF  
RSVRHMIYDLIEWRSQILSGTLPQDELKELKKKVTAKIDYGNRILDDLVRDEEDGNI  
LDPELTSTISLFRAHEIASKQVEERLQEEKSQKQONIDINRQAKFAATPSLALFVNLKNV  
CKIGEDAIEVMSLYDPVESKFISENYLVRWSSSGLPKDIDRLHNLRAVFTDLGSKDLK  
REKISFVCQIVRVGRMELRDNNTRKLTSGLRPFVAVMDVTDIINGKVDDKQHF  
IPFQPVAGENDFLQTVINKVIAAKEVNHKGQGLWVTLKLLPGDIHQIRKEFPFLVDRT  
TAVARKTGFPFIIMP GDVRNDIYVTLVQGD FDKGSKTTAKNVEVTVSVYDEDGKRLE  
HVIFPGAGDEAISEYKSVIYYQVKQPRWFETVKVAIPIEDVNRSHLRFTFRHRSSQDSK  
DKSEKIFALAFVKLMRYDGTTLRDGEHDLIVYKAEAKKLEDAATYLSLPSTKAELEE  
KGHSATGKSMQSLGCTISKDSFQISTLVCSTKLTQNVDLLGLLKWRSNTSLLQQNLR  
QLMKVDGGEVVKFLQDTLDALFNIMMENSESETFDTLVFDALVFIIGLIADRFQHFN  
PVLETYIKKHFSATLAYTKLTKVLKNYVDGAKEPGVNEQLYKAMKALESIFKFIVRS  
RILFNQLYENKGEADFVESLLQLFRSINDMMSSMSDQTVRVKGAALKYLPTIVNDVK  
LVFDPKELSKMFTFILNVP MGLLTIQKLYCLIEIVHSDLFTQHDCREILLPMMTDQLK  
YHLERQEDLEACCQLLSHILEVLYRKDVGPTQRHVQIIMEKLLRTVNRTVISMGRDSE  
LIGNFVACMTAILRQMEDYHYAHLIKTFGKMRTDVVDFLMETFIMFKNLIGKNVYPF  
DWVIMNMVQNKVFLRAINQYADMLNKKFLDQANFELQLWNNYFHLAVAFLTQESL  
QLENFSSAKRAKILNKYGDMRRQIGFEIRDMWYNLGQHKIKFIPEMVGPIEMTLPIE  
TELKATIPFIFFDMMQCEFHSTRSFQMFENEIITKLDHEVEGGRGDEQYKVLFDKILLE  
HCRKHKYLAKTGETFVKLVVRLMERLLDYRTIMHDENKENRMSCTVNVNLFYKEIE  
REEMYIRYLYKCLDLHKECDNYTEAAYTLLHAKLLKWSERVEDVCAHLTQRDGYQA  
TTQGQLKEQLYQEIIHYFDKGKMWEEAIALGKELAEQYENEMFDYEQLSELLKKQA  
QFYENIVKVIRPKPDYFAVGYYGQGFPFLRGKVFIYRGKEYERREDFEARLLTQFPN  
AEKMKTTSPPGDDIKNSPGQYIQCFVTKPKLDLPPKFHRPVSEQIVSFYRVNEVQRFE  
YSRPIRKGEKNPDNEFANMWIERTIYTTAYKLPILRWFEVKSVMVEISPLENAIETM  
QLTNDKINSMVQQHLDDPSLPINPLSMLLNGIVDPAVMGGFANYEKAFFTDTRYLQEH  
PEAHEKIEKLKDLIAWQIPFLAEGIRIHGDKVTEALRPFHERMEACFKQLKEKVEKEY  
GVRIMPSSLD DRRGSRPRSMVRSFTMPSSSRPLSVASVSSLSSDSTPSRPGSDGFALPL  
LPKMHRSRQDKLDKDDLEKEKKDKKKEKRN SKHQEIFEKEFKPTDISLQQSEAVILS  
ETISPLRPQRPKSQVMNVIGSERRFSVSPSSPSSQQT PPPVT PRAKLSFSMQSSLELNGM  
TGADVADVPPPLPLKGSVADYGNLMENQDLLGSPTPPPPPPHQRHLPPLPSKTPPPPP  
PKTTRKQASVD SGIVQ





# Article

---





## Research paper

# The C-terminal polyproline-containing region of ELMO contributes to an increase in the life-time of the ELMO-DOCK complex

Marion Sévajol<sup>a,1</sup>, Jean-Baptiste Reiser<sup>a,1</sup>, Anne Chouquet<sup>a</sup>, Julien Pérard<sup>a,b</sup>, Isabel Ayala<sup>c</sup>, Pierre Gans<sup>c</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>a,\*</sup>, Dominique Housset<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Immune response to pathogens and altered-self group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, 41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France

<sup>b</sup> Unit of Virus Host Cell Interactions, Unité Mixte Internationale 3265, Centre National de la Recherche Scientifique, European Molecular Biology Laboratory, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, 6 rue Jules Horowitz, F-38042 Grenoble, France

<sup>c</sup> Biomolecular NMR spectroscopy group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, 41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 May 2011

Accepted 29 November 2011

Available online 6 December 2011

### Keywords:

DOCK180

ELMO

Phagocytosis

Cell motility

NMR

SPR

## ABSTRACT

The eukaryotic Engulfment and Cell Motility (ELMO) proteins form an evolutionary conserved family of key regulators which play a central role in Rho-dependent biological processes such as engulfment and cell motility/migration. ELMO proteins interact with a subset of Downstream of Crk (DOCK) family members, a new type of guanine exchange factors (GEF) for Rac and cdc42 GTPases. The physiological function of DOCK is to facilitate actin remodeling, a process which occurs only in presence of ELMO. Several studies have determined that the last 200 C-terminal residues of ELMO1 and the first 180 N-terminal residues of DOCK180 are responsible for the ELMO-DOCK interaction. However, the precise role of the different domains and motifs identified in these regions has remained elusive. Divergent functional, biochemical and structural data have been reported regarding the contribution of the C-terminal end of ELMO, comprising its polyproline motif, and of the DOCK SH3 domain. In the present study, we have investigated the contribution of the C-terminal end of ELMO1 to the interaction between ELMO1 and the SH3 domain of DOCK180 using nuclear magnetic resonance spectroscopy and surface plasmon resonance. Our data presented here demonstrate the ability of the SH3 domain of DOCK180 to interact with ELMO1, regardless of the presence of the polyproline-containing C-terminal end. However, the presence of the polyproline region leads to a significant increase in the half-life of the ELMO1-DOCK180 complex, along with a moderate increase on the affinity.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

The highly conserved eukaryotic ELMO proteins cooperate with certain members of the DOCK family and are involved in several cellular processes such as engulfment and cell motility [1]. The ELMO family protein from *C. elegans*, CED12, was originally identified in a screen for genes that control necrotic and apoptotic cell phagocytosis [2]. CED12 and its mammalian orthologs ELMO1 and ELMO2 have been shown to cooperate with CRKII and DOCK180 upstream of the activation of the small GTPase Rac1 [3]. DOCK family members are multidomain proteins with a Guanine

Exchange Factor (GEF) function for Rho-family GTPases, conveyed by a DOCK Homology Region (DHR-2). DOCK proteins regulate several Rac1- and cdc42-dependent processes that rely on actin cytoskeleton remodeling including phagocytosis and cell migration. Although the DHR-2 domain of DOCK180 has been shown to be sufficient to act as a GEF for Rac1 both *in vitro* and *in cellulo* [4,5], DOCK180 needs to cooperate with ELMO for proper Rac1 signaling *in vivo* [3,6–9]. Indeed, ELMO has been shown to help DOCK180 stabilize the nucleotide free form of Rac1 [7], to relieve the auto-inhibition of DOCK [10], and to facilitate the recruitment of DOCK to the membrane through a RhoG-activated ELMO interaction [11–13].

The N-terminal sequence of ELMO contains a first domain called RBD (residues 1–115) which interacts with GTP-loaded RhoG [11,14]; a second domain (EID, residues 115–280) which is known to interact with ERM proteins [14] and which is related to the Diaphanous Inhibitory Domain [14,15]; and the ELMO domain

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 76 20 94 48.

\*\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 76 20 94 69.

E-mail addresses: [jean-philippe.kleman@ibs.fr](mailto:jean-philippe.kleman@ibs.fr) (J.-P. Kleman), [dominique.housset@ibs.fr](mailto:dominique.housset@ibs.fr) (D. Housset).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

(residues 318–491), which is distantly related to ELMOD2 Arl2 GAP proteins [16]. The C-terminal end of ELMO contains a Pleckstrin homology (PH) domain (residues 555–675) flanked by two  $\alpha$ -helices (N $\alpha$ h: 532–558 and C $\alpha$ h: 680–699) and a polyproline motif containing flexible fragment (PxxP: 700–727, including proline at positions 707, 710–712, 714, 717).

A direct interaction involving the C-terminal region of ELMO1 and the N-terminal region of DOCK180 was strongly suggested by co-precipitation and engulfment rescuing experiments [3,8,9] and was mapped to the last 200 residues of ELMO1 and the first 200 residues of DOCK180 [5]. More specifically, co-precipitation experiments initially suggested that the SH3 domain of DOCK could interact with the PxxP motif of ELMO [3]. Subsequently, different functional assays have demonstrated the role of the ELMO PxxP motif and/or the SH3 domain of DOCK in engulfment [9] or cell migration [5,10]. The involvement of the ELMO C $\alpha$ h helix has also been demonstrated. Extensive mutagenesis of residue in C $\alpha$ h (L689A, M691S, E692D, R696K, L697A and L698A) was shown to cause a complete loss of cell migration [12]. It was also demonstrated, rather surprisingly, that a DOCK180 construct lacking the SH3 domain was still able to interact with ELMO and promote cell migration. Côté and colleagues subsequently demonstrated using pull-down assays that both the ELMO PxxP motif and the DOCK180 SH3 domains were dispensable for a tight ELMO-DOCK interaction [5]. From these data a minimal fragment of ELMO capable of interacting with DOCK was defined. This region includes the PH related homology region and its two flanking  $\alpha$ -helix extensions (532–707). Hydrophobic residues on the N $\alpha$ h  $\alpha$ -helix appear to be critical for DOCK180 binding. On the DOCK side, the region spanning residues 1–187 has been demonstrated to harbor the ELMO binding site, with a preponderant role for the 69–187 stretch [5].

The coordinates of a three-dimensional (3D) structure of the ELMO1 C-terminal region including the PH domain and the PxxP motif in complex with the first 167 residues of DOCK2 were recently released by the protein data bank (PDB; entry code 3A98). The 3D structure confirms that both of the  $\alpha$ -helices that flank the PH domain of ELMO and the 69–167  $\alpha$ -helical bundle of DOCK are involved in the previously proposed binding interface [5]. However, an extensive interaction between the SH3 of DOCK and the PxxP motif of ELMO was also revealed. This interaction is consistent with functional data that suggest that the PxxP motif of ELMO and the SH3 domain of DOCK contribute to enhance actin cytoskeleton remodeling. It further confirms the ability of the ELMO polyproline motif to canonically interact with SH3 domains, as previously observed for the Hck SH3 domain [17].

In order to assess how the ELMO1 polyproline motif and the SH3 domain of DOCK could be implicated in the ELMO-DOCK complex formation, we investigated the interaction between ELMO1 and the SH3 domain of DOCK180 by surface plasmon resonance (SPR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Our data clearly show that the SH3 domain of DOCK180 interacts significantly with ELMO1. Furthermore, the C-terminal end of ELMO, containing the last  $\alpha$ -helix C $\alpha$ h and the PxxP motif, is shown to contribute to the affinity of ELMO1 for the SH3 domain of DOCK180 by a factor 2.5 to 5 and leads to a significant decrease of the dissociation rate (by 3–5 times), indicating that the PxxP-SH3 interaction may increase the life-time of the ELMO-DOCK complex *in vivo*, supporting its functional significance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning

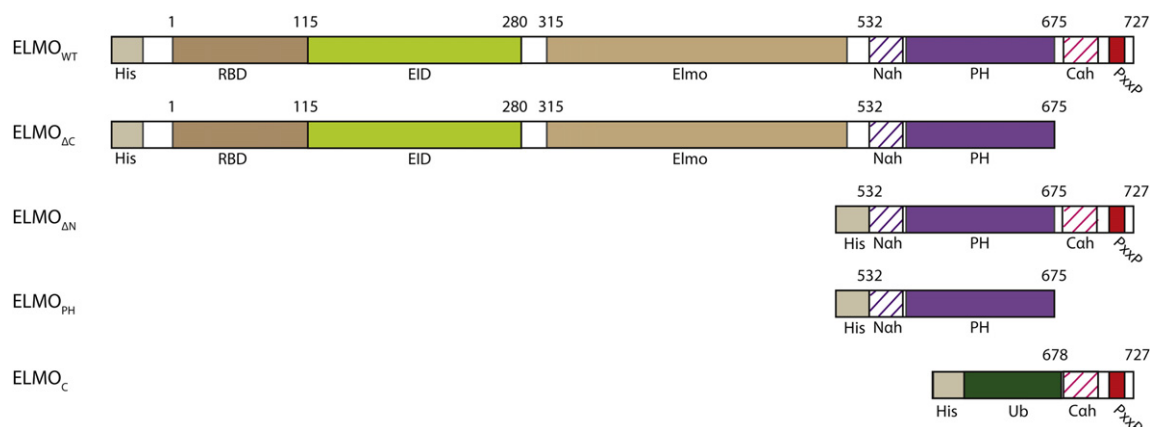
The cDNA encoding the wild type murine ELMO1 was kindly provided by Dr Yoshinori Fukui. Full length and truncated forms of ELMO1 (Fig. 1) were generated by PCR and cloned into the pPROEXHtb vector using ligation-independent cloning [18] in frame with a 6His tag.

The C-terminal ELMO1 polypeptide ELMO<sub>C</sub> (residues 678–727) was sub-cloned in fusion with Ubiquitin and a 6His tag into pHub-H SacII EcoRI (see [supplementary material](#)).

The cDNA coding for the human DOCK1-SH3 domain (9–72) was optimized for bacterial expression, synthesized (Geneart AG) and cloned into the NcoI and EcoRI sites of pET-28a.

### 2.2. Expression and purification

The protein constructs were overexpressed in *E. coli* BL21-DE3 cells using conventional IPTG induction. For ELMO1 constructs, cells were lysed using a Microfluidizer® (Microfluidics) in Phosphate-Buffered Saline, supplemented with DNase (25 µg/ml), 1 mM MgCl<sub>2</sub> and Complete® cocktail (Roche Diagnostics). The lysate was clarified by centrifugation and loaded on a Ni-NTA column (Qiagen). The protein was eluted by imidazole and further purified by gel filtration. DOCK180 SH3 is expressed as inclusion bodies. Cells were lysed (Fastprep®, MP biochemicals) in 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl. Inclusion bodies were pelleted by centrifugation and washed successively with 2 M NaCl, 2% Triton, and lysis buffer. A final wash was performed before the inclusion bodies were solubilized in 8 M urea. Unfolded SH3 was further



**Fig. 1.** Sketch of the ELMO constructs. Full length ELMO<sub>WT</sub> (top) and ELMO<sub>ΔC</sub> 1–675, ELMO<sub>PH</sub> 532–675 and ELMO<sub>ΔN</sub> 532–727 truncated forms of ELMO1 were expressed fused to an N-terminal 6His tag. A polypeptide comprising the C-terminus of ELMO (ELMO<sub>C</sub>; residues 678–727) was expressed as a fusion with His-Ubiquitin (see [supplementary material](#) for details).

purified by size exclusion chromatography in 6 M Urea. Purified SH3 was refolded by dialysis against Tris-NaCl buffer and stored in 5% glycerol.

ELMO<sub>C</sub> purification was achieved by nickel affinity chromatography. NiNTA resin was equilibrated in 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, Complete®, 5 mM 2-mercaptoethanol and the bound protein was eluted with imidazole before being further purified by size exclusion chromatography. Where specified, Ubiquitin was removed by Ubiquitin-Hydrolase as published [19]. The quality of the purified polypeptide was assessed by mass spectrometry.

### 2.3. SPR experiments

The interaction between ELMO1 and the SH3 domain of DOCK180 was analyzed by SPR using a BIAcore 3000 (GE Healthcare) at 25 °C. Purified SH3 domain was diluted to 20 µg/ml in 10 mM sodium acetate, pH 4.1 and was immobilized by classical amine coupling onto two adjacent cells of a CM5 sensor-chip at a flow rate of 5 µl/min using 25 mM sodium phosphate pH 8.0, 100 mM NaCl and 0.005% surfactant P20 as running buffer. The blank cell was generated by ethanolamine deactivation of the activated surface. Preliminary experiments carried out with different ELMO constructs unambiguously showed a specific binding to the sensor-chip coupled SH3 domain (data not shown). However, as most common chip regeneration procedures failed to remove the bound ELMO without damaging the coupled SH3 domain, we decided to use the single cycle kinetic titration approach [20]. Each cycle consisted of five successive injections of increasing protein concentrations, at a flow rate of 30 µl/min using a 200 s contact time and a 400 s dissociation time. Prior to each protein binding cycle, the running buffer was injected for a five-step cycle. This buffer response was used as a blank for double-reference.

Kinetics parameters were initially evaluated within the context of a Langmuir 1:1 model using the BIAevaluation3.1 software. However, the fit obtained was not optimal, with  $\chi^2$  values ranging from 2.5 to 4 for data obtained with the higher level of SH3 immobilization. Consequently, the freely available general purpose fitting software, Fityk [21], was used to analyze our data. Fityk scripts defining integrated rate equations for the 1:1 and double ligand models were used to perform non-linear global fitting on the two curves corresponding to the two SH3 immobilization levels simultaneously. We based our analysis on the 1:1 model derived kinetic constants.

### 2.4. NMR spectroscopy

ELMO1 peptides 702–716 and 700–727 were chemically synthesized (NeoMPS, Strasbourg, France). Recombinant uniformly-labeled SH3 was overexpressed in *E. coli* bacteria grown in M9 minimal medium, as previously described [22], and purified as described above.

Uniformly [<sup>15</sup>N]-labeled samples of the SH3 domain of DOCK180 were prepared to a concentration of 0.2 mM in 18 mM Tris-base buffer, pH 7.2, 10% D<sub>2</sub>O and [<sup>13</sup>C <sup>15</sup>N]-labeled SH3 in 25 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10% D<sub>2</sub>O, 5% glycerol. Interactions between ELMO1 peptides and the SH3 domain were investigated by the addition of aliquots of a concentrated solution of unlabeled chemically synthesized peptide (typically 12 mM ELMO<sub>702–716</sub>, or 8 mM ELMO<sub>700–727</sub>) directly to isotope-labeled SH3 domain to a final molar ratio of 1:7. An equimolar sample of ELMO<sub>C</sub> and SH3 were prepared by adding 500 µL of a 60 µM sample of cleaved ELMO<sub>C</sub> to the same volume of a 60 µM SH3 before concentration of the mixture to a final volume of 450 µL. Complexes between the SH3 domain and ELMO<sub>WT</sub>, ELMO<sub>ΔN</sub> or peptides were prepared by addition of aliquots of a concentrated solution of the unlabeled

sample (typically 800 µM) directly to an 80 µM sample of isotope-labeled SH3 domain to achieve a final molar ratio of 1:1.1. NMR spectra were recorded at 25 °C on either a Varian Inova 800 MHz or DirectDrive 600 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) cryoprobe and shielded z-gradients. All NMR experiments were acquired using standard pulse sequences supplied in the Varian Protein Pack (available at [www.varianinc.com](http://www.varianinc.com)) with an experimental duration between 42 and 44 min. Data were processed and analyzed with the nmrPipe/nmrDraw suite of programs [23].

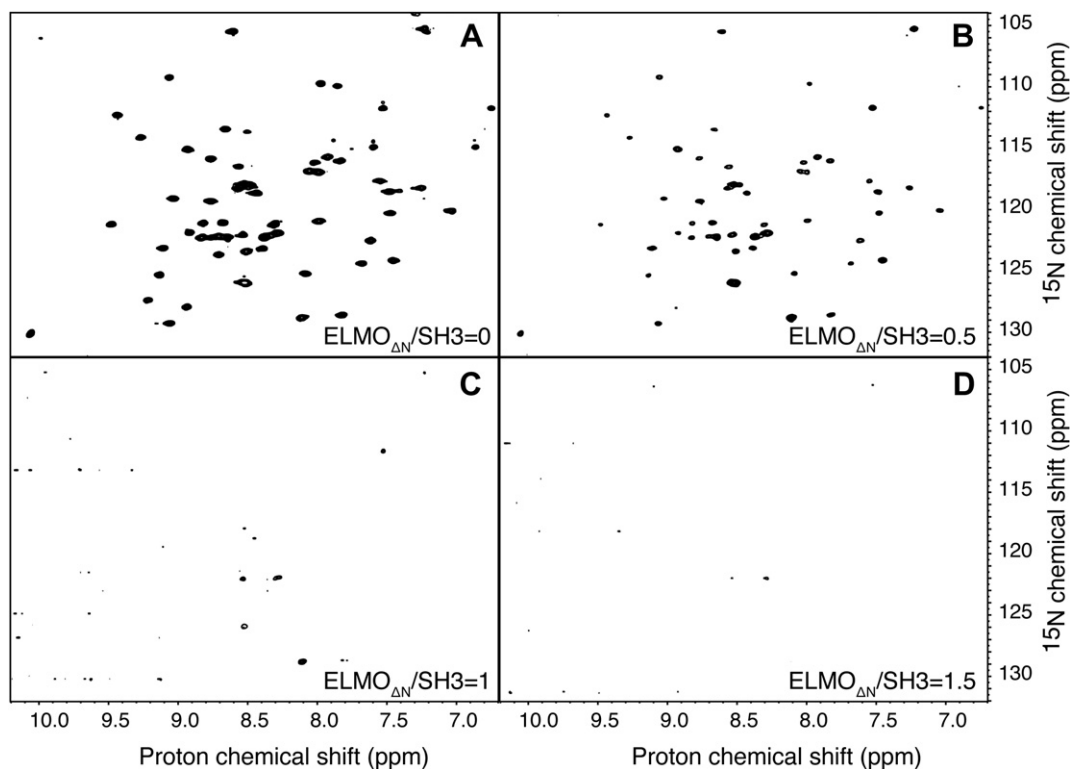
## 3. Results and discussion

In order to determine the precise contribution of the ELMO C-terminal region to the ELMO-DOCK complex formation, we performed a series of different binding experiments by NMR spectroscopy and SPR techniques. We tested the interaction of a short construct of DOCK180 SH3 domain (residues 9–72, hereafter named SH3) with several ELMO1 constructs (Fig. 1), including: the full length ELMO1 (ELMO<sub>WT</sub>); the ELMO1-1-675 N-terminal fragment (ELMO<sub>ΔC</sub>); the ELMO1 fragment lacking the first 531 residues (ELMO<sub>ΔN</sub>); the ELMO1 PH domain including the N $\alpha$ h helix (residues 532–675, ELMO<sub>PH</sub>); and C-terminal peptides containing the PxxP motif (702–716, 700–727, and ELMO<sub>C</sub> 678–727).

In contrast with published experiments [5], our preliminary NMR experiments clearly show that the DOCK180 SH3 domain can interact with ELMO<sub>WT</sub> in solution. Addition of a stoichiometric amount of 727 residue ELMO<sub>WT</sub> protein to [<sup>15</sup>N]-labeled SH3 domain leads to complete disappearance of the SH3 NMR signal, confirming the binding of the SH3 domain to this large protein (data not shown). Addition of the ELMO1 C-terminal region (ELMO<sub>ΔN</sub>), leads to a similar result (Fig. 2), clearly indicating that the SH3 binding zone is located in this C-terminal part. Fig. 2 also shows that the impact on SH3 NMR spectra increases with the amount of ELMO<sub>ΔN</sub>, suggesting a dose dependent effect.

However, previously published results suggested a very limited role, if any, of the ELMO polyproline motif in the complex formation with DOCK180 [5,12]. In order to evaluate this assumption, we studied the interactions between the [<sup>15</sup>N] labeled SH3 domain and the ELMO<sub>702–716</sub> or ELMO<sub>700–727</sub> peptides. Very small chemical shift variations were observed for a small number of NH correlations and only with a large excess of peptide. Chemical shifts also increase with the amount of peptide added to the solution, further supporting a dose dependent phenomenon (Fig. 3). Taking into account the experimental conditions, these data suggests that the affinity is very weak.

These preliminary results induced a more quantitative investigation using SPR. Binding experiments of both ELMO<sub>WT</sub> and ELMO<sub>ΔC</sub> on the sensor-chip-immobilized SH3 domain were performed and clearly demonstrated a specific binding of both ELMO constructs. The use of the single cycle kinetics titration approach [20] allowed us to obtain for the first time, estimates of the kinetic parameters characterizing the ELMO1-SH3 interaction. The 1:1 Langmuir model was used and yielded a reasonable fit between measured and theoretical curves (Fig. 4). Interestingly, we observed that the ELMO<sub>ΔN</sub> and ELMO<sub>PH</sub> constructs also interacted specifically with the immobilized SH3 domain (data not shown), although no kinetic parameter could be reliably estimated. The comparison of the equilibrium dissociation constant (*K<sub>D</sub>*) obtained by SPR showed up to a 5-fold higher affinity for wild type ELMO1 than for the ELMO<sub>ΔC</sub> construct. However, this difference suggests a small energetic contribution (about 1 kcal/mol, as calculated by the difference in *K<sub>D</sub>*) of the PxxP containing C-terminal end of ELMO1 to the overall stabilization of the complex, in agreement with NMR data described above. Differences in *k<sub>off</sub>* are the most significant and

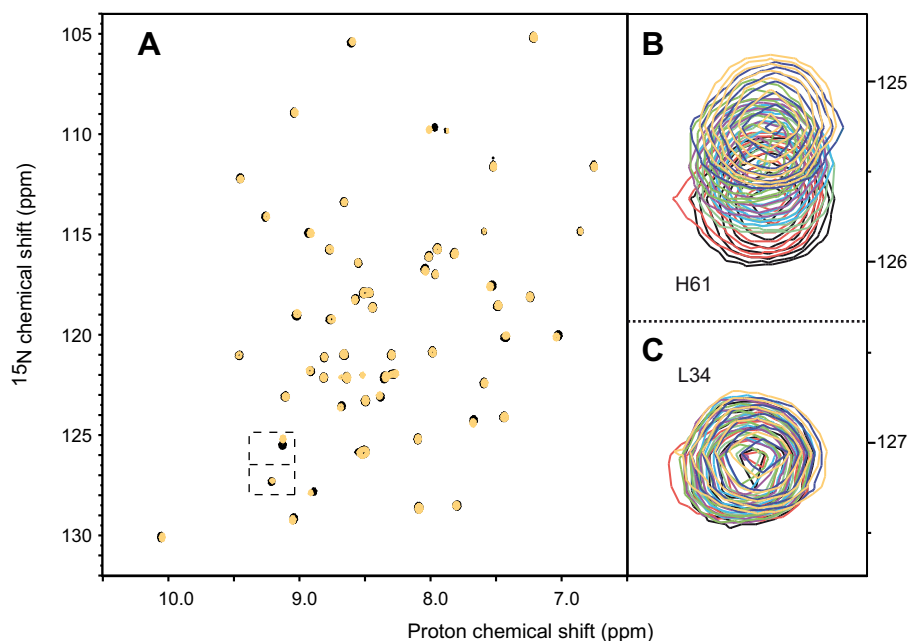


**Fig. 2.** 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of Ubiquitin-tagged [ $^{15}\text{N}$ ]-labeled SH3 (Ub- $^{15}\text{N}$  SH3) domain in the presence of (A) 0; (B) 0.5; (C) 1.0; and (D) 1.5 equivalents of ELMO $_{\Delta\text{N}}$ . NMR data was collected using an 800 MHz spectrometer at 25 °C.

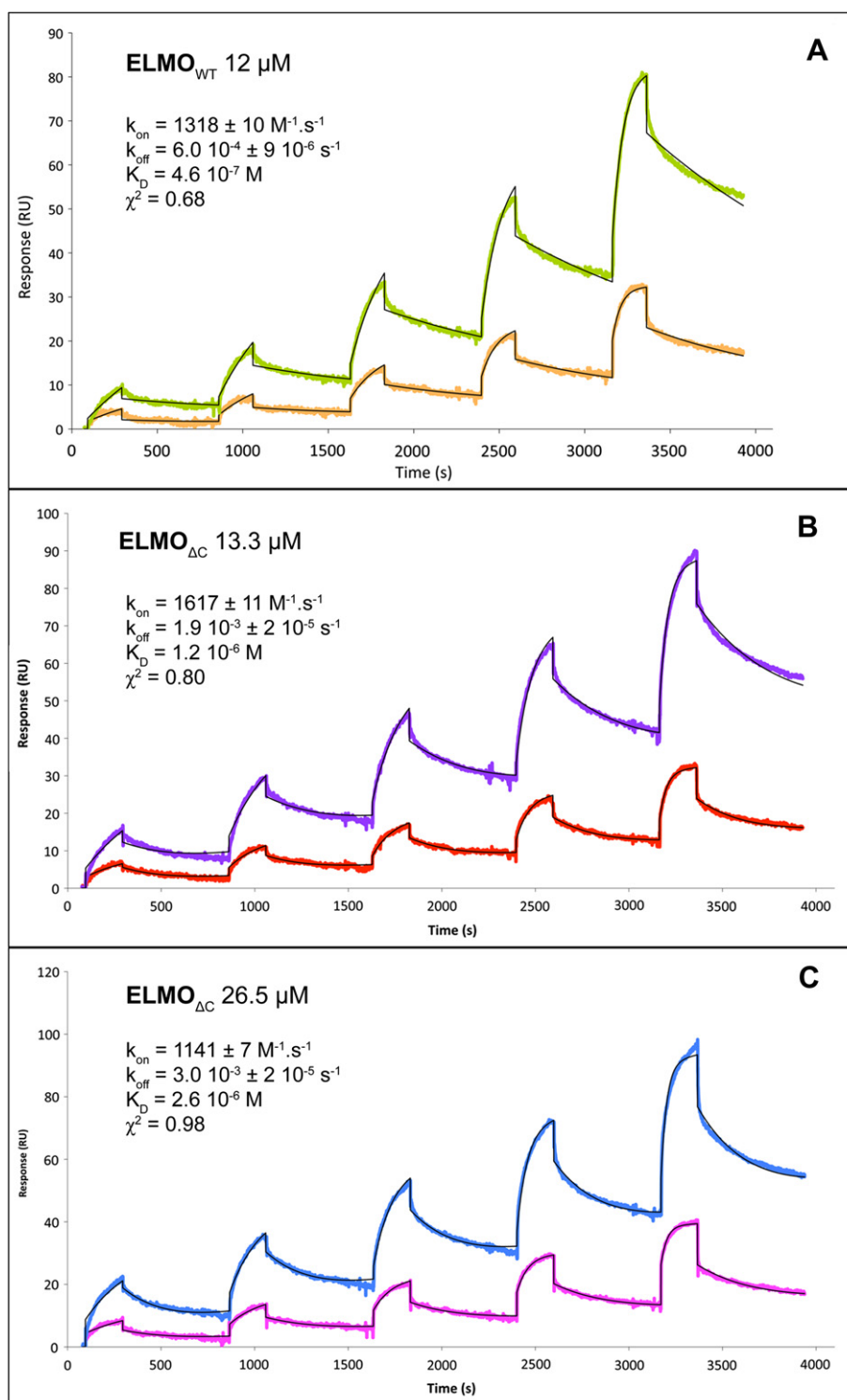
indicate a 5 times slower dissociation rate for the full length ELMO1 in comparison to its truncated form.

The structure of ELMO1 C-terminus (530–727) in complex with the N-terminal region of DOCK2 (1–177, PDB entry 3A98)

reveals the nature of the interface between the DOCK SH3 domain (1–69) and ELMO. The most surprising observation is the extent of the interaction between the PxxP containing C-terminal end of ELMO (700–727) and the DOCK SH3 domain. This interaction,



**Fig. 3.** 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of 200  $\mu\text{M}$  Ub- $^{15}\text{N}$  SH3 acquired using a 600 MHz spectrometer at 25 °C. (A) In the left panel, Ub- $^{15}\text{N}$  SH3 alone (black) and in presence of 7 equivalent amounts of the 702–716 peptide (yellow). In the right panel, the changes in ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) resonance frequencies of (B) H61 and (C) L34 in response to the addition of increasing concentrations of 702–716 peptide. Each superposed spectrum is colored as described on the figure. The final 703–726 peptide concentration was 1.4 mM. The large excess of peptide required to induce variations in chemical shift indicates that, under these conditions, the affinity of the SH3 domain for the 702–716 peptide is in the millimolar range. Peak assignments were previously made on a U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  SH3 using conventional 3D NMR experiments (data not shown). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 4.** SPR sensorgrams of ELMO<sub>WT</sub> (A) and ELMO<sub>ΔC</sub> (B, C) binding to immobilized SH3. The single cycle kinetic method was used with 5 two-fold dilutions series. Green and orange curves (panel A) correspond to the measured response for ELMO<sub>WT</sub> with two different levels of SH3 immobilization (730 and 1700 RU, respectively). ELMO<sub>WT</sub> was injected at 5 increasing concentrations: 0.75 μM, 1.5 μM, 3 μM, 6 μM, 12 μM. Panel B and C correspond to the measured response for ELMO<sub>ΔC</sub> with the same two levels of SH3 immobilization. ELMO<sub>ΔC</sub> was injected at 5 increasing concentrations: 0.83 μM, 1.66 μM, 3.3 μM, 6.6 μM, 13.3 μM (purple and red curves, panel B) and 1.66 μM, 3.3 μM, 6.6 μM, 13.3 μM, 26.5 μM (blue and pink curves, panel C). Fitted curves were calculated using a 1:1 Langmuir model with the software, Fityk [21] using non-linear optimization of integrated rate equations and are depicted with black solid lines. Kinetic constants derived from these curves are provided. The fit quality was reasonable, with  $\chi^2$  values of 0.68 (1.03 for the green curve and 0.33 for the orange curve) for ELMO<sub>WT</sub>, 0.80 (1.27 for the purple curve and 0.30 for the red curve) for ELMO<sub>ΔC</sub> at 13.25 μM concentration and 0.98 (1.53 for the blue curve and 0.42 for the pink curve) for ELMO<sub>ΔC</sub> at 26.5 μM concentration. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

which buries approximately 1200 Å<sup>2</sup> for each fragment, represents about 52% of the whole ELMO-DOCK interface area (Figure S1). Another 3D structure of a chimeric protein in which the polyproline stretch of ELMO1 was fused to DOCK2-SH3,

clearly confirms the extent of this binding (PDB entry 2RQR). This chimeric structure also shows that the polyproline of ELMO1 interacts in an essentially canonical way with the SH3 domain of DOCK2. Since the N-terminal 167 residues of DOCK180 shares 60%



identity and 87% similarity with DOCK2, ELMO1 binding to DOCK180 is very likely to be similar. This large interface seems at odds with co-precipitation experiments in which both the ELMO polyproline and the DOCK SH3 domains appeared to be dispensable for a full ELMO-DOCK interaction [5,12]. A significant part of the SH3 surface (340 Å<sup>2</sup>) is buried by the two  $\alpha$ -helices (N $\alpha$ h: 210 Å<sup>2</sup> and C $\alpha$ h: 130 Å<sup>2</sup>) that flank the ELMO1 PH domain (Figure S1). Our binding data suggest that most of the binding free energy is contributed by the SH3-ELMO1-N $\alpha$ h interface. A possible explanation for low energetic contribution of ELMO1<sub>700–727</sub> may be found in its intrinsic flexibility. This region is predicted to be unstructured and the conformation adopted in both 3A98 and 2RQR structures does not contain any secondary structure element. This region is thus likely to be fully disordered in the unbound form of ELMO1. Accordingly, the entropic cost to stabilize this stretch in the conformation observed in the complex with DOCK2<sub>1–177</sub> may compensate the enthalpic benefit of forming this large interface. Our data also suggest that the ELMO1 C $\alpha$ h helix, absent in our ELMO $\Delta$ C construct does not greatly contribute to the interaction with the SH3 domain. This result contradicts previous observations where mutations in the C $\alpha$ h helix were shown to impair the promotion of cell migration and co-precipitation with DOCK180 [12]. In solution, NMR spectroscopic studies suggest that the ELMO<sub>C</sub> region binds weakly to SH3 (data not shown), further confirming our observations. However, it is not possible to exclude a slight change of the SH3 docking mode in the absence of this  $\alpha$ -helix, where the loss of interactions with the ELMO N $\alpha$ h helix could be balanced by new ones within the C $\alpha$ h helix. Yet, the limited change in affinity reported here argues against a drastically different binding mode.

Our data may help to provide an explanation for the apparent contradiction between previously published functional and interaction data that sought to describe the role of both the ELMO PxxP motif and the DOCK SH3 domain in the ELMO-DOCK interaction. Indeed, on one hand, several functional assays indicated that the loss of the ELMO1 PxxP motif had a negative impact on engulfment rescuing capacity [9] or on cell migration [5]. On the other hand, the absence of either the SH3 domain or the ELMO1 PxxP had no effect on the strength of the ELMO-DOCK interaction, as analyzed by pull-down assays [5]. In order to resolve this apparent contradiction, Komander et al. suggested that the PxxP motif and the SH3 could interact with functionally significant, yet unidentified biological partners. The small impact of the presence of the PxxP motif on the affinity is consistent with co-precipitation experiments. The fact that the formation of a complex between the DOCK180 SH3 domain and ELMO1 was not observed [5,12] may also be explained by the relatively low affinity (0.5  $\mu$ M) between these two entities. Remarkably, we observed a five-fold difference in  $k_{off}$  between wild type ELMO1 and its  $\Delta$ C fragment. As a consequence, the half-life of the ELMO-SH3 complex is five times longer (20 min) than that of the ELMO $\Delta$ C-SH3 complex (4 min). Thus, we propose that the functional role of the PxxP motif – SH3 interaction relies on its ability to increase both the life-time of the ELMO-DOCK complex and, albeit modestly, the overall stability of the complex.

## Acknowledgments

We thank Isabelle Bally and Nicole Thielens, from the IBS platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS), for assistance and access to the SPR facility, Ombeline Pessey and Madalen Le Gorrec for their assistance in the protein production step and Michael Plevin for the careful reading of the manuscript. Part of this work was financially supported by the Cluster 10 from Région Rhône-Alpes.

## Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biochi.2011.11.014.

## References

- [1] M. Lu, K.S. Ravichandran, Dock180-ELMO cooperation in Rac activation, *Meth Enzymol.* 406 (2006) 388–402.
- [2] S. Chung, T.L. Gumienny, M.O. Hengartner, M. Driscoll, A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 931–937.
- [3] T. Gumienny, E. Brugnera, A. Tosello-Trampont, J. Kinchen, L. Haney, K. Nishiwaki, S.F. Walk, M. Nemerout, I. Macara, R. Francis, T. Schedl, Y. Qin, L. Van Aelst, M. Hengartner, K. Ravichandran, CED-12/ELMO, a novel member of the Crkl/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration, *Cell* 107 (2001) 27–41.
- [4] J.-F. Côté, K. Vuori, Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4901–4913.
- [5] D. Komander, M. Patel, M. Laurin, N. Fradet, A. Pelletier, D. Barford, J. Cote, An alpha-helical extension of the ELMO1 pleckstrin homology domain mediates direct interaction to DOCK180 and is critical in Rac signaling, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 4837–4851.
- [6] E. Brugnera, L. Haney, C.M. Grimsley, M. Lu, S.F. Walk, A. Tosello-Trampont, I. Macara, H. Madhani, G. Fink, K. Ravichandran, Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 574–582.
- [7] M. Lu, J. Kinchen, K. Rossman, C.M. Grimsley, C. deBakker, E. Brugnera, A. Tosello-Trampont, L. Haney, D. Klingele, J. Sondek, M. Hengartner, K. Ravichandran, PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 756–762.
- [8] Y. Wu, M. Tsai, L. Cheng, C. Chou, N. Weng, *C. elegans* CED-12 acts in the conserved crkl/Dock180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment, *Dev. Cell* 1 (2001) 491–502.
- [9] Z. Zhou, E. Caron, E. Hartwig, A. Hall, H. Horvitz, The *C. elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway, *Dev. Cell* 1 (2001) 477–489.
- [10] M. Lu, J. Kinchen, K. Rossman, C.M. Grimsley, M. Hall, J. Sondek, M. Hengartner, V. Yajnik, K. Ravichandran, A steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs, *Biol. Cell* 15 (2005) 371–377.
- [11] C. deBakker, L. Haney, J. Kinchen, C.M. Grimsley, M. Lu, D. Klingele, P. Hsu, B. Chou, L. Cheng, A. Blangy, J. Sondek, M. Hengartner, Y. Wu, K. Ravichandran, Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO, *Curr. Biol.* 14 (2004) 2208–2216.
- [12] C.M. Grimsley, J. Kinchen, A. Tosello-Trampont, E. Brugnera, L. Haney, M. Lu, Q. Chen, D. Klingele, M. Hengartner, K. Ravichandran, Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6087–6097.
- [13] H. Katoh, M. Negishi, RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo, *Nature* 424 (2003) 461–464.
- [14] C.M. Grimsley, M. Lu, L.B. Haney, J.M. Kinchen, K.S. Ravichandran, Characterization of a novel interaction between ELMO1 and ERM proteins, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5928–5937.
- [15] M. Patel, Y. Margaron, N. Fradet, Q. Yang, B. Wilkes, M. Bouvier, K. Hofmann, J.-F. Côté, An evolutionarily conserved autoinhibitory molecular switch in ELMO proteins regulates Rac signaling, *Curr. Biol.* (2010) 1–7.
- [16] J. Bowzard, D. Cheng, J. Peng, R. Kahn, ELMOD2 is an Arl2 GTPase-activating protein that also acts on Arfs, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 17568–17580.
- [17] M.P. Scott, F. Zappacosta, E.Y. Kim, R.S. Annan, W.T. Miller, Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28238–28246.
- [18] C. Aslanidis, P. de Jong, Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 6069–6074.
- [19] T. Kohno, H. Kusunoki, K. Sato, K. Wakamatsu, A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with <sup>15</sup>N and <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C, *J. Biomol. NMR* 12 (1998) 109–121.
- [20] R. Karlsson, P.S. Katsamba, H. Nordin, E. Pol, D.G. Myszka, Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors, *Anal. Biochem.* 349 (2006) 136–147.
- [21] M. Wojdyr, Fityk: a general-purpose peak fitting program, *J. Appl. Cryst.* 43 (2010) 1126–1128.
- [22] D. Bouvier, C. Vanhaverbeke, J. Simorre, G.J. Arlaud, I. Bally, V. Forge, R.L. Margolis, P. Gans, J.-P. Klemm, Unusual Ca(2+)-calmodulin binding interactions of the microtubule-associated protein F-STOP, *Biochemistry* 42 (2003) 11484–11493.
- [23] F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, Nmrpipe – a multidimensional spectral processing system based on unix pipes, *J. Biomol. Nmr* 6 (1995) 277–293.



## Supplementary Material

### Material and Methods

#### pHub-H Ubiquitin fusion vector construction :

The pHub-H vector was designed for the convenient expression and purification of small proteins or peptides in fusion with a 6His-tagged human Ubiquitin. The Ubiquitin is used as a carrier protein to produce target polypeptides in the soluble fraction after overexpression in *E.coli* bacteria systems. The insertion of a SacII restriction site at the Ubiquitin cDNA 3' end, allowed the cloning of the target sequence in frame with a Ubiquitin-Hydrolase proteolysis site. After overexpression and purification of the fusion protein, 6His-tagged Ubiquitin, can be removed from the target polypeptide by Ubiquitin-Hydrolase without leaving extra residues at the N-terminus of the target sequence. Indeed, Yeast Ubiquitin-Hydrolase cleaves just after the latest Ubiquitin glycine (See R.T. Baker, S.A. Smith, R. Marano, J. McKee, P.G. Board, Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase, J Biol Chem 269 (1994) 25381-25386.).

The pET41c vector (Novagen) was used as a kanamycin resistant template for pHub-H construction. pET41c was first digested by NdeI and EcoRI enzymes to remove the GST sequence. The human Ubiquitin cDNA sequence was used as a template for PCR using the following

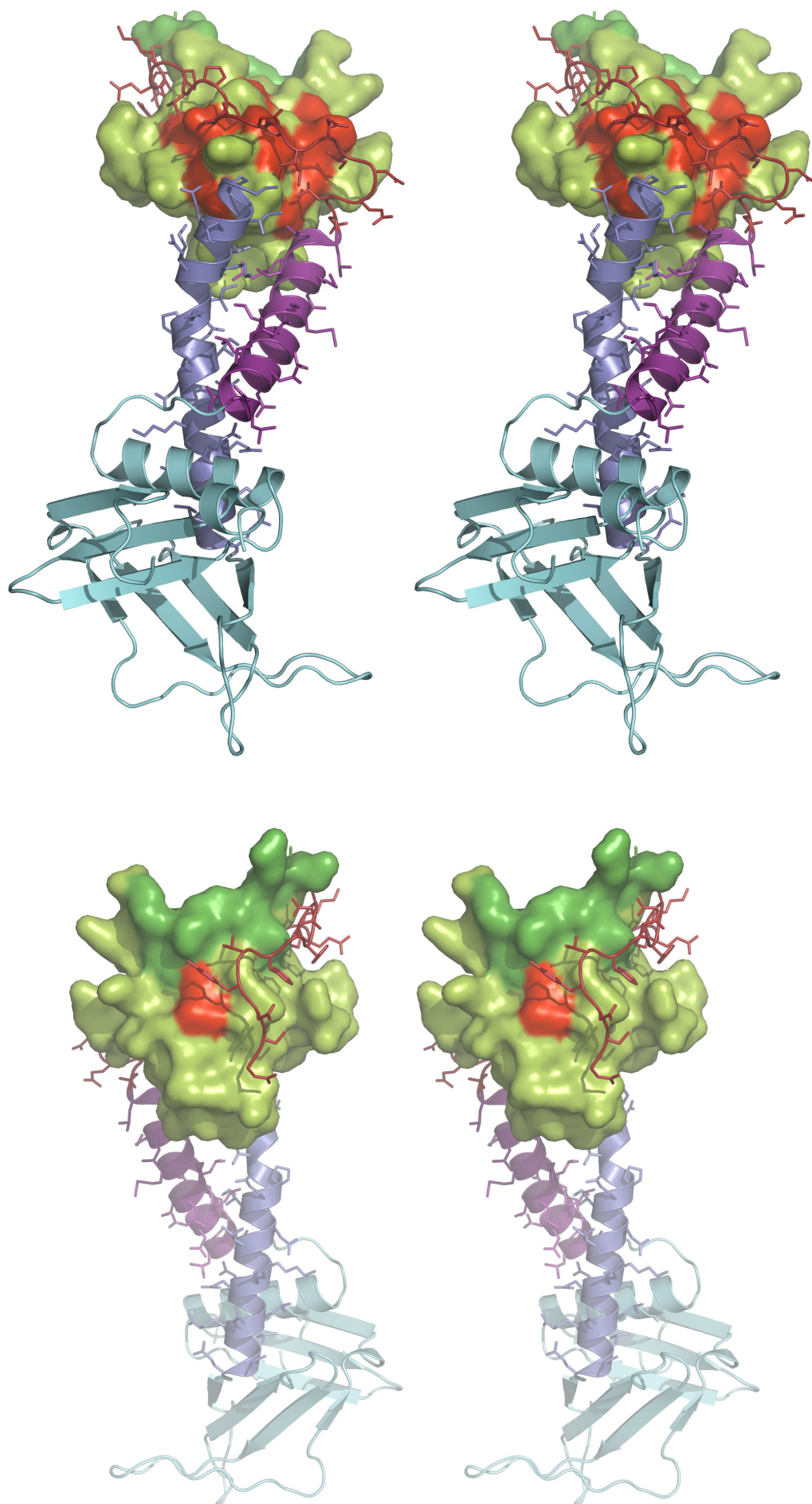
	DNA	primer	sequences
5'	AATTCCATATGCACCACCACCACCACCCCGGGATGCAGATCTTCGTC	AAGA	
C3'	and 5'TTCCGGAATTCCACCACCGCGGAGACGTAAGACAAGATGTAAGG3'		

Amplification with these primers results in the addition of a 5' NdeI and 3' SacII and EcoRI restriction sites and a 6His-tag at the N-terminus of the Ubiquitin. The PCR product was purified and digested by NdeI and EcoRI and further ligated into NdeI-EcoRI sites of pET41c to obtain the pHub-H vector.

### Figures Legends

**Figure S1:** Stereoscopic views of the DOCK180 SH3 model and the ELMO1 regions interacting with it. This model is based on the ELMO1-SH3-DOCK2 structure recently deposited in the PDB (pdb entry code 3A98). The SH3-DOCK180 model has been made by mutating the SH3-DOCK2 residues according to a sequence alignment made using CLUSTALW. Rotamers of mutated residues were manually adjusted in order to avoid steric clashes. The SH3 is represented by its molecular surface in green, except for amino-acids that were shown to be involved in the interaction with ELMO<sub>WT</sub>, as investigated by NMR chemical shift mapping (G14, V15, F17, N19, Y20, L30, G33, L39, G48, F60, A62, Y64, H66, L67, data not shown), depicted in red. The ELMO1 PH domain is depicted in cyan and the ELMO1 Nah and Cah helices are depicted in blue and purple, respectively. The ELMO1 PxxP containing C-terminal end (residues 700-727) is shown in brick red. The two views are rotated by 180° along the vertical axis.

**Figure S1**





## **Caractérisation structurale et biophysique de Elmo1 et des interactions avec son partenaire : Une protéine impliquée dans les voies de signalisation du remodelage du cytosquelette d'actine.**

### **Résumé :**

Les protéines eucaryotes Elmo (Engulfment and Cell Motility) forment une famille de régulateurs conservés qui jouent un rôle central dans les processus biologiques reposant sur le remodelage du cytosquelette d'actine comme la phagocytose et la migration cellulaire et régulé par les GTPases de la famille Rho. Les protéines Elmo régulent la fonction des protéines Dock (Downstream of Crk), qui sont des Facteurs d'Echange de Guanine (GEF) atypiques pour les GTPases Rac1 et Cdc42. Le mécanisme de régulation connu à ce jour, repose sur l'interaction entre les 200 résidus C-terminaux d'Elmo et les 180 premiers résidus N-terminaux de Dock. Cependant, le rôle précis des différents domaines et motifs identifiés dans ces régions n'est pas encore défini. En effet, les données fonctionnelles, biochimiques et structurales rapportées à ce jour semblent contradictoires quant à la contribution de l'extrémité C-terminale d'Elmo qui comprend un motif polyproline et le domaine SH3 N-terminal de Dock.

Nous avons donc étudié la contribution de l'extrémité C-terminale de Elmo1 à l'interaction entre Elmo1 et le domaine SH3 de Dock1 en utilisant notamment la résonance plasmonique de surface. Nos données démontrent la capacité du domaine SH3 de Dock1 à interagir avec Elmo1, indépendamment de l'extrémité C-terminale contenant le motif polyproline. Toutefois, la présence de cette région conduit à une augmentation significative du temps de demi-vie du complexe Elmo1/Dock1. En parallèle, des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles nous ont permis de déterminer des enveloppes tridimensionnelles de la protéine Elmo1. Ces données nous permettent ainsi de proposer un premier modèle à basse résolution dans lequel nous localisons les parties N et C-terminales de Elmo1. De façon surprenante cette étude semble indiquer un changement de conformation de la région N-terminale de Elmo1 ainsi qu'une interaction possible de cette même région avec le domaine SH3 de Dock1.

**Mots clés :** Elmo, Dock, Rac, actine, phagocytose, migration cellulaire, SPR, SAXS.

## **Structural and biophysical characterisation of Elmo1 and of interactions with a binding partner : A protein involved in actin cytoskeleton remodeling pathway.**

### **Abstract :**

The eukaryotic Elmo proteins (Engulfment and cell Motility) form a conserved regulatory family that plays a central role in a number of processes that depend on actin cytoskeleton remodeling, such as phagocytosis and cell migration. Elmo proteins regulate the function of Dock proteins (Downstream of Crk), a new family of atypical guanine exchange factors (GEF) for Rac1 and Cdc42 GTPases. The regulation of this mechanism is based on the interaction between the 200 C-terminal residues of Elmo and the 180 N-terminal residues of Dock. However, the precise role of the different domains and motifs identified in these regions is still not well defined. Indeed, functional, structural and biochemical data reported to date seem contradictory with respect to the contribution of the C-terminal end of Elmo, which includes a polyproline motif, and the N-terminal SH3 domain of Dock.

We have therefore investigated the contribution of the C-terminal region of Elmo1 to the interaction between Elmo1 and the SH3 domain of Dock1 using surface plasmon resonance. Our data demonstrate the ability of the SH3 domain of Dock1 to interact with Elmo1 independently of the C-terminal polyproline containing region. However, the presence of this region induces a significant increase in the half-life of the Elmo1/Dock1 complex. In parallel, small angle X-ray experiments were recorded. These data allowed us to propose the first low-resolution model of Elmo1 in which we can locate N and C-terminal regions. Surprisingly, this study suggests a conformational change of the N-terminal region of Elmo1 and a possible interaction of this same region with the SH3 domain of Dock1.

**Keywords :** Elmo, Dock, Rac, actin, phagocytosis, cell migration, SPR, SAXS,